



Raquel Filipa Anunciação das Dores Trindade

Licenciatura em Ciências da Engenharia Química e
Bioquímica

**Determinação rápida de parâmetros
analíticos através da Espetrometria de
Infravermelho Próximo por
Transformada de Fourier (FT-NIR)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Paula Allen Lopes, Engenheira, Sovena
Portugal – Consumer Goods

Coorientador: Pedro Simões, Professor Doutor, FTC-
UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio

Arguente (s): Prof. Doutor Eduardo Manuel Hipólito Pires

Vogal (ais): Engenheira Paula Cristina Allen Lopes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química e Bioquímica

Do aluno

Raquel Filipa Anunciação das Dores Trindade

Nº 34038

Do Mestrado Integrado em Engenharia Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências e
Tecnologias – Universidade Nova de Lisboa

Determinação rápida de parâmetros analíticos através da Espectroscopia de Infravermelho
Próximo por Transformada de Fourier (FT-NIR)

Orientador: Paula Allen Lopes, Engenheira, Sovena Portugal – Consumer Goods

Coorientador: Pedro Simões, Professor Doutor, FC-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Fernando José Eusébio

Arguente (s): Prof. Doutor Eduardo Manuel Hipólito Pires

Vogal (ais): Engenheira Paula Cristina Allen Lopes

Setembro de 2017

Copyright

Determinação rápida de parâmetros analíticos através da Espetroscopia de Infravermelho próximo por Transformada de Fourier.

Copyright © Raquel Filipa Anunciação das Dores Trindade, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aproveito este espaço para agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho e por todo o apoio que recebi de modo a ser possível alcançar esta etapa na minha vida académica.

À minha orientadora, Engenheira Paula Allen Lopes, um agradecimento especial pela oportunidade, compreensão, disponibilidade e pelo privilégio de ter realizado o estágio no Laboratório da Fábrica da Sovena – Consumer Goods do Barreiro.

Ao Grupo Sovena, em particular à Diretora Fabril Maria Lina Dionísio, pela oportunidade e por ter aceiteado este estágio curricular de modo a elaborar a minha dissertação de mestrado.

A todo o laboratório de controlo de qualidade, em especial a todos os membros do laboratório da qualidade do Barreiro, pois sem eles a análise de todas as amostras para o trabalho não era possível, por toda a ajuda, disponibilidade e por todo o conhecimento que transmitiram em relação aos óleos e azeites durante a realização do estágio.

Ao Professor Mário Eusébio, pela sua ajuda e dedicação na procura de uma empresa e pela sua disponibilidade no esclarecimento de dúvidas ao longo deste trabalho.

Ao Professor Pedro Simões, Co-orientador da dissertação, por tudo o que ensinou e conhecimento que transmitiu ao longo deste curso.

À Faculdade de Ciências e Tecnologias e ao Departamento de Química, pelo privilégio de fazer parte de uma instituição que continua a evoluir e a acreditar na formação dos seus alunos e proporcionou a minha evolução para o futuro.

A todos os meus amigos, agradeço pela compreensão e apoio que foi dado ao longo destes anos e principalmente nesta etapa.

Por fim, um especial agradecimento a toda a minha família pela oportunidade que me deram de realizar este curso, por todo o apoio, presença durante nesta etapa e de fazerem sempre o possível para me ajudar no meu futuro.

Ao Carlos, um eterno obrigado por toda a paciência e motivação que foi transmitida e por ter acreditado em mim de modo a alcançar esta etapa.

Muito obrigado por tudo.

Esta página foi deixada em branco propositadamente

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a determinação rápida de parâmetros físico-químicos dos óleos vegetais e azeite. A técnica abordada foi a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), para a obtenção de espectros na gama dos 4000-12500 cm⁻¹, onde se detetam as transições de vibrações moleculares.

Em primeiro lugar foram testados os modelos referentes aos óleos de soja crú, girassol crú e girassol refinado para a obtenção dos resultados estatísticos (RMSEP, R² e RPD). Conforme o resultado, concluiu-se que o modelo do ácido gordo C18:3 do girassol crú apresentava problemas em relação à sua capacidade preditiva. Será importante a contínua otimização dos modelos em termos de gama e precisão.

Posteriormente realizou-se a validação do método interno, FT-NIR, avaliando a sua exatidão por comparação com os métodos de referência. Aplicou-se o teste estatístico, teste t das diferenças (amostras emparelhadas), avaliando a proximidade dos resultados entre os dois métodos. Foram validados os parâmetros dos óleos e azeite virgem extra, acidez, índice de peróxidos, absorvâncias no UV, ácidos gordos e esteróis, de acordo com o critério de aceitação do teste $t_{exp} \leq t_{tab}$.

Procedeu-se também ao estudo da precisão do método através da repetibilidade calculando o limite de repetibilidade (r) e o coeficiente de variação (CVr). Tal como previsto o método apresentou um valor de $r \leq 5\%$.

Por último, iniciou-se o estudo de misturas dos óleos de soja e girassol e do azeite virgem extra para testar a sensibilidade do equipamento FT-NIR. Foram estabelecidos critérios que irão permitir uma mais rápida tomada de decisão na análise de amostras de controlo.

Palavras-chave: FT-NIR; óleos vegetais; azeite; validação do método; precisão; misturas de óleos.

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Abstract

This work aimed to develop and validate a protocol to analyse faster the physicochemical parameters of vegetable oils and olive oil. The FT-NIR technology were used to obtain a 4000-12500 cm^{-1} spectra range, allowing the detection of the molecular vibrations and transitions.

First, we tested reference models for crude soy oil and crude and refined sunflower oil to obtain the statistic results (RMSEP, R^2 e RPD).

We concluded that the C18:3 fatty acid model of crude sunflower oil showed problems regarding their predictive ability. It will be important to keep optimizing the gamma and precision of the models.

Afterward, the validation of internal method was performed, FT-NIR, assessing their accuracy through the comparison with the reference methods. The difference t test was applied (paired samples), allowing the proximity of the results between both methods. The oils and extra virgin olive oil parameters were validated, such as acidity, peroxide index, UV absorbance and fatty acid and sterols, according with $t_{\text{exp}} \leq t_{\text{tab}}$ acceptance test. The method precision was also performed evaluating the repeatability limit (r) and variance coefficient (CVR). As expected, the method showed $r \leq 5\%$ as a result.

Lastly, we started to study the mixture between soy oil, sunflower oil and extra virgin olive oil, to test the FT-NIR sensitivity. Criteria have been established to allow a faster and more efficient decision-making in the analysis of control samples.

Key words: FT-NIR, vegetable oils; olive oil; method validation; accuracy; oil mixture

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Índice

Copyright	IV
Agradecimentos.....	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XVII
Abreviaturas	XXI
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	5
2.1. História do Grupo Sovena	5
2.2. Grupo Sovena	6
2.3. Oleos Vegetais	7
2.3.1. A importância dos Oleos Vegetais	7
2.3.2. Tipos de Óleos Vegetais	8
2.3.3. Composição dos Óleos Vegetais	10
2.4. Azeite.....	14
2.4.1. A importância do Azeite.....	14
2.4.2. Categorias de Azeite	16
2.4.3. Composição do Azeite.....	17
2.5. Métodos de Análise de Referência – Óleos Vegetais.....	19
2.5.1. Acidez	19
2.5.2. Índice de Peróxidos	20
2.5.3. Índice de Anisidina	21
2.5.4. Absorvâncias no UV	22
2.5.5. Composição em Ácidos Gordos	23
2.5.6. Outros parâmetros de Análise.....	26
2.6. Métodos de Análise de Referência- Azeite	27
2.6.1. Acidez	27
2.6.2. Índice de Peróxidos.....	28
2.6.3. Absorvâncias no UV	29
	XI

2.6.4.	Composição em Ácidos Gordos	31
2.6.5.	Composição em Esteróis	33
2.6.6.	Outros Parâmetros de Análise	34
2.7.	Espectroscopia de Infravermelho Próximo	36
2.7.1.	Breve História	36
2.7.2.	Princípios Teóricos	36
2.7.3.	Equipamento NIR com Transformada de Fourier (FT-NIR)	40
2.7.4.	Vantagens e Desvantagens da aplicação de NIRS	42
2.8.	Quimiometria	43
2.9.	Análise Multivariável	44
2.9.1.	Algoritmo PLS	44
2.9.2.	Validação dos Modelos	47
3.	Materiais e Métodos	49
3.1.	Equipamento FT-NIR	49
3.2.	Procedimento de Aquisição de espectros e Elaboração de Modelos	51
4.	Resultados e Discussão	53
4.1.	Modelos Existentes	53
4.2.	Validação do Método	59
4.2.1.	Testes Comparativos	59
4.2.2.	Resultados do Teste t das diferenças (amostras emparelhadas)	63
4.3.	Estudo da Precisão do método	69
4.3.1.	Comparação da Precisão entre métodos	75
4.4.	Misturas	76
4.4.1.	Ensaio Piloto	76
4.4.2.	Critérios para as análises de misturas	83
5.	Conclusão	87
5.1.	Perspetivas Futuras	88
6.	Bibliografia	89
7.	Anexos	91
7.1.	Anexo A: Diagrama de Extração do Azeite	91
7.2.	Anexo B: Amostras	92

7.2.1. Gama de valores das amostras	92
7.2.2. Espetros das amostras	94
7.3. Anexo C: Tabela FT-NIR	96
7.4. Anexo D: Misturas	97
7.4.1. Espetros das misturas.....	97
7.4.2. Resultados das misturas.....	97
7.4.3. Resultados dos Critérios	106

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

Índice de Figuras

FIGURA 2.1 - ÁREAS DE NEGÓCIO DO GRUPO SOVENA. ADAPTADO DE [7]	6
FIGURA 2.2 - ILUSTRAÇÃO DO ESPETRO ELETROMAGNÉTICO. ADAPTADO DE [22].	37
FIGURA 2.3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MODOS VIBRACIONAIS FUNDAMENTAIS DA MOLÉCULA DE ÁGUA. ADPTADO DE [25]	39
FIGURA 2.4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PRÍNCIPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM FT-NIR. ADAPTADO DE [25].	41
FIGURA 2.5 - EXEMPLIFICAÇÃO DO PRÍNCIPIO DO MÉTODO DE REGRESSÃO PLS. ADAPTADO DE [25]	45
FIGURA 3.1 –EQUIPAMENTO MPA DA BRUKER. ADAPTADO DE [32]..	50
FIGURA 3.2 - PERCURSO ÓTICO DO MODELO MPA DA BRUKER UTILIZADO. ADAPTADO DE [32]	50
FIGURA 3.3 - EQUIPAMENTO UTILIZADO NO TRABALHO DESENVOLVIDO.....	51
FIGURA 3.4 - COMPARTIMENTO PARA LEITURA DE AMOSTRAS.....	51
FIGURA 4.1 - ILUSTRAÇÃO DO TESTE FEITO PARA O MODELO DA ACIDEZ ÀS AMOSTRAS DE ÓLEO DE SOJA CRU.....	54
FIGURA 4.2 - ILUSTRAÇÃO DAS DIFERENÇAS DE VALORES PREVISTOS E VERDADEIROS PARA A ACIDEZ ÀS AMOSTRAS DE ÓLEO DE SOJA CRU.....	55
FIGURA 4.3 - ILUSTRAÇÃO DO TESTE FEITO PARA O K230 DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.....	58
FIGURA 4.4 - PERCENTAGENS DAS MISTURAS DE ÓLEOS VEGETAIS DO ENSAIO PILOTO.....	76
FIGURA 7.1 - DIAGRAMA DA EXTRAÇÃO DO AZEITE ADAPTADO DE [14]	91
FIGURA 7.2 - ESPETROS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE SOJA CRU.....	94
FIGURA 7.3 - ESPETROS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE GIRASSOL CRU.....	94
FIGURA 7.4 - ESPETROS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.....	95
FIGURA 7.5 - ESPETROS DAS BANDAS DO ESPETRO INFRAVERMELHO E POSIÇÕES RELATIVAS ÀS ABSORÇÕES PROEMINENTES NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	96
FIGURA 7.6 - CONJUNTO DE ESPETROS ADQUIRIDOS DA ELABORAÇÃO DE MISTURAS	97

Índice de Tabelas

TABELA 2.1- PROPRIEDADES FÍSICAS DOS ÓLEOS DE SOJA, GIRASSOL, COLZA, MILHO E AMENDOIM.	9
TABELA 2.2 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO ÓLEO DE SOJA.	10
TABELA 2.3 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO ÓLEO DE GIRASSOL.	11
TABELA 2.4 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO ÓLEO DE COLZA.	12
TABELA 2.5 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO ÓLEO DE MILHO.	13
TABELA 2.6 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO ÓLEO DE AMENDOIM.	13
TABELA 2.7 - PROPRIEDADES FÍSICAS DO AZEITE.	15
TABELA 2.8- COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NO AZEITE.	17
TABELA 2.9 - COMPOSIÇÃO TÍPICA DE ESTERÓIS NO AZEITE.	18
TABELA 2.10 - LIMITES DE ÍNDICE DE PERÓXIDOS NOS ÓLEOS VEGETAIS.	21
TABELA 2.11 - COMPOSIÇÃO TÍPICA DE ÁCIDOS GORDOS NOS ÓLEOS VEGETAIS.	25
TABELA 2.12 - TOMA DE ENSAIO DE ACORDO COM O ÍNDICE DE ACIDEZ.	27
TABELA 2.13 - VALOR DA ACIDEZ DE ACORDO COM O TIPO DE AZEITE.	28
TABELA 2.14 - VALOR DE K270 E K232 PARA CADA TIPO DE AZEITE.	30
TABELA 2.15 - VALOR DE ΔK PARA CADA TIPO DE AZEITE.	30
TABELA 2.16 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GORDOS NOS AZEITES VIRGEM E REFINADO.	32
TABELA 2.17 - EXEMPLIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO EM ESTERÓIS DO AZEITE.	34
TABELA 2.18 - COMPRIMENTOS DE ONDA EM NM E NÚMEROS DE ONDA EM cm^{-1} DE ALGUMAS BANDAS NIR.	38
TABELA 3.1- PARÂMETROS A USAR NO SOFTWARE DO EQUIPAMENTO NA RECOLHA DOS ESPECTROS.	52
TABELA 4.1 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO MODELO DA ACIDEZ DO ÓLEO DE SOJA CRU.	55
TABELA 4.2 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS MODELOS DOS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE SOJA CRU.	55
TABELA 4.3 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO MODELOS DOS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE GIRASSOL CRU.	56
TABELA 4.4 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO MODELOS DOS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.	57
TABELA 4.5 - RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS PARÂMETROS K270 E K230 DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.	57
TABELA 4.6 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA A ACIDEZ DO ÓLEO DE SOJA CRU.	63
TABELA 4.7 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE SOJA CRU.	63

TABELA 4.8 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA A ACIDEZ DO ÓLEO DE GIRASSOL CRÚ.	64
TABELA 4.9 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE GIRASSOL CRÚ.	64
TABELA 4.10 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA A ACIDEZ DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.	65
TABELA 4.11 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.	65
TABELA 4.12 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA A ACIDEZ DO ÓLEO DE SOJA REFINADO.	66
TABELA 4.13 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ÁCIDOS GORDOS DO ÓLEO DE SOJA REFINADO	66
TABELA 4.14 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA A ACIDEZ, PERÓXIDOS E ABSORVÂNCIAS NO UV DO AZEITE VIRGEM EXTRA.	67
TABELA 4.15 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ÁCIDOS GORDOS DO AZEITE VIRGEM EXTRA.....	67
TABELA 4.16 - RESULTADOS DOS PRINCIPAIS PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DO TESTE T PARA OS ESTERÓIS DO AZEITE VIRGEM EXTRA.	68
TABELA 4.17 - CÁLCULO DA MÉDIA E DESVIO-PADRÃO PARA O ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA A ACIDEZ DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.	71
TABELA 4.18 - CÁLCULO DA MÉDIA E DESVIO-PADRÃO PARA O ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA AS ABSORVÂNCIAS NO UV DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.....	71
TABELA 4.19 - RESULTADOS DO ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA A ACIDEZ E ABSORVÂNCIAS NO UV DO ÓLEO DE GIRASSOL REFINADO.....	72
TABELA 4.20 - CÁLCULO DA MÉDIA E DESVIO-PADRÃO PARA O ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA A ACIDEZ DO AZEITE VIRGEM EXTRA.....	73
TABELA 4.21 - CÁLCULO DA MÉDIA E DESVIO-PADRÃO PARA O ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA AS ABSORVÂNCIAS NO UV DO AZEITE VIRGEM EXTRA.....	73
TABELA 4.22 - RESULTADOS DO ESTUDO DA REPETIBILIDADE PARA A ACIDEZ E ABSORVÂNCIAS NO UV DO AZEITE VIRGEM EXTRA.....	74
TABELA 4.23 - RESULTADOS DA COMPARAÇÃO DA PRECISÃO ENTRE OS MÉTODOS. 75	
TABELA 4.24 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DOS ÓLEOS DE SOJA-GIRASSOL QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.	78
TABELA 4.25 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DOS ÓLEOS DE GIRASSOL-SOJA QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.	79

TABELA 4.26 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DE ÓLEO DE SOJA-AZEITE QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS	80
TABELA 4.27 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DO AZEITE-ÓLEO DE SOJA QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.	81
TABELA 4.28 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DO ÓLEO DE GIRASSOL-AZEITE QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.	82
TABELA 4.29 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA MISTURA DO AZEITE-ÓLEO DE GIRASSOL QUE APRESENTARAM ALTERAÇÕES SIGNIFICATIVAS DO PERFIL DE ÁCIDOS GORDOS.	83
TABELA 4.30 - QUADRO DAS REPETIBILIDADES PARA OS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2.....	85
TABELA 7.1 - GAMA DE VALORES DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE SOJA CRÚ	92
TABELA 7.2 - GAMA DE VALORES DAS AMOSTRAS DO ÓLEO DE GIRASSOL CRÚ	93
TABELA 7.3 - RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA GIRASSOL-SOJA. PARTE A	98
TABELA 7.4 - RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA SOJA-GIRASSOL. PARTE A.....	99
TABELA 7.5 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA GIRASSOL-SOJA. PARTE B	100
TABELA 7.6 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA SOJA-GIRASSOL.PARTE B	101
TABELA 7.7 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA SOJA-AZEITE.PARTE C.....	102
TABELA 7.8 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA GIRASSOL-AZEITE. PARTE C.....	103
TABELA 7.9 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA AZEITE-SOJA. PARTE C.....	104
TABELA 7.10 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS DA MISTURA AZEITE-GIRASSOL. PARTE C.....	105
TABELA 7.11 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA SOJA-GIRASSOL.....	106
TABELA 7.12 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA GIRASSOL-SOJA.....	106
TABELA 7.13 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA AZEITE-SOJA.....	106
TABELA 7.14 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA AZEITE-GIRASSOL.....	107

TABELA 7.15 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA SOJA-AZEITE.....	107
TABELA 7.16 – RESULTADOS DOS ÁCIDOS GORDOS C18:1 E C18:2 PARA A MISTURA GIRASSOL-AZEITE.....	107

Abreviaturas

AGE – Ácidos Gordos Essenciais

AVE – Azeite Virgem Extra

AV – Anisidine Value

CUF – Companhia União Fabril

EUA – Estados Unidos da América

FT-NIR – Espetroscopia de Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier (Fourier Transformation – Infrared)

FIR - Infravermelho longínquo (Far Infrared)

GC – Cromatografia Gasosa (Gas chromatography)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-Performance Liquid Chromatography)

IP – Índice de Peróxidos

ISO – Norma Internacional

IV – Infravermelho

KI – Iodeto de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

MIR – Infravermelho Médio (Mid-Infrared)

MPA – Multi Purpose Analyser

NaOH – Hidróxido de Sódio

NIR – Infravermelho Próximo (Near- Infrared)

NIRS - Near-Infrared Spectroscopy

NP – Norma Portuguesa

OVP – OPUS Validation Program

PCA – Análise dos Componentes Principais (Principal Component Analysis)

PLS – Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Squares)

ppm – partes por milhão

R^2 – Coeficiente de determinação

RMECV – Raiz Quadrada do Erro Médio da Validação Cruzada (Root Mean Square Error of Cross Validation)

RMSEE – Raiz Quadrada do Erro Médio de Estimação (Root Mean Square Error of Estimation)

RMSEP – Raiz Quadrada do Erro Médio de Predição (Root Mean Square Error of Prediction)

RPD – Desvio Residual de Previsão (Residual Prediction Deviation)

SC – Soja Crú

TAGs - Triacilgliceróis

UV - Ultravioleta

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

1. Introdução

Os óleos e gorduras são as principais vias de armazenamento de energia dos organismos, conferindo aos alimentos consistência, estabilidade e sabor. [1]

Os óleos vegetais desempenham um papel importante no organismo como transportadores de ácidos gordos essenciais (AGE). [2]

Estes ácidos gordos não são sintetizados no organismo, mas são necessários para manter a integridade e estrutura das membranas celulares. O consumo de óleos vegetais genuínos tem sido essencial para a manutenção de uma boa dieta e no controlo de problemas de saúde. Por esse motivo, são produtos cada vez mais usados no quotidiano conferindo aos consumidores nutrientes importantes face aos seus benefícios. [2]

A qualidade de um alimento é vista como o somatório de diversas características, nomeadamente, a sua estabilidade, o seu valor nutricional e as características organoléticas. Assim, a qualidade final de um determinado óleo vegetal depende principalmente da matéria-prima que lhe deu origem. O controlo de qualidade deverá iniciar-se desde o início, ou seja, desde a semente oleaginosa ou fruto e não apenas durante as fases de processamento do óleo. [3]

O azeite é reconhecido como a gordura mais saudável e com os melhores benefícios para a saúde. O consumo de azeite tem vindo a aumentar significativamente, com particular incidência nos segmentos aos quais é reconhecida maior qualidade, como o azeite virgem extra. [4]

Sendo a Sovena, uma empresa com origem em Portugal e que se encontra estabelecida num mercado internacional, é importante garantir a qualidade dos seus produtos, com as especificações acordadas chegando assim mais perto do consumidor. Para alcançar este objetivo, os seus laboratórios levam a cabo um controlo de qualidade rigoroso e participam em ensaios de comparação interlaboratorial.

Para avaliar a qualidade do azeite e dos óleos vegetais devem ser considerados vários parâmetros determinados por diferentes técnicas. No caso dos óleos estão incluídos os seguintes parâmetros: acidez, peróxidos (IP), p-anisidina (AV), composição em ácidos gordos, entre outros. [1]

Contudo, a indústria alimentar também enfrenta o problema da adulteração de produtos. Em certos casos a adulteração é subtil não sendo identificada por um único ensaio.

É fundamental assegurar técnicas que permitam assegurar a autenticidade, sendo por vezes necessário incorporar diversas técnicas de análise. [1]

Os produtos incluídos neste estudo foram os óleos de soja e girassol (crus e refinados) e quanto ao azeite, estudou-se o azeite virgem extra.

Relativamente aos parâmetros, estudou-se a acidez, o índice de peróxidos, a absorvância no ultravioleta, a composição em ácidos gordos e os esteróis.

As recomendações e especificações para estes produtos foram consultadas na legislação nacional e europeia e respetivos documentos técnicos. Os métodos de determinação dos parâmetros dos óleos e azeites encontram-se presentes em normas portuguesas, europeias, internacionais e na própria legislação.

A determinação rápida de parâmetros dos óleos vegetais e azeite foi o principal objetivo do trabalho desenvolvido. A técnica abordada foi a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR).

A espectroscopia de infravermelho próximo tem sido uma técnica bem estabelecida no setor agrícola ao longo do tempo.

Nos dias de hoje, é um elemento importante no controlo de qualidade na indústria alimentar. [4]

Os espectrofotómetros com transformada de Fourier, são equipamentos de multiusos que permitem a análise de amostras líquidas ou sólidas. Estes equipamentos são ferramentas importantes e ideais para análises não destrutivas e rápidas de oleaginosas e óleos ao longo de todo o processo de fabricação. [5]

Comparando com os métodos de referência para a análise de óleos e azeites, ou seja, as técnicas de química clássica e cromatografia que implicam o uso de reagentes, materiais e analistas experientes, a tecnologia FT-NIR tem muitas vantagens e não implica o consumo de reagentes ou produtos químicos perigosos (Química Verde). [5]

Um espectro de infravermelho próximo (12 500 - 4000 cm^{-1}) é composto de bandas de combinação e de sobreposição que estão relacionadas às frequências de absorção na região do infravermelho médio (MIR). Como cada composto possui uma combinação única de átomos, nenhum composto produz exatamente o mesmo espectro do infravermelho próximo. [6]

Recorrendo a algoritmos de software e tratamentos estatísticos, a espectroscopia NIR é uma ferramenta para análise quantitativa.

Concluindo, neste trabalho testaram-se os modelos matemáticos presentes no espectrofotómetro com transformada de Fourier (FT-NIR) que previam os parâmetros analíticos dos óleos e azeites mencionados anteriormente e recolheram-se os espectros.

Estudou-se a exatidão, validando o método interno (FT-NIR), e a precisão face aos métodos de referência.

Por fim, iniciou-se o estudo de misturas de óleos e azeites para testar a sensibilidade do equipamento relativamente à presença de adulterações e estabeleceu-se critérios.

Combinada com outras técnicas, a metodologia FT-NIR pode fornecer informações suplementares em relação à adulteração dos produtos. [6] A frequente adulteração dos óleos leva a tomar medidas de controlo da sua qualidade. São várias as técnicas para caracterizar a identidade dos óleos vegetais, incluindo os ácidos gordos, esteróis, entre outros.

Esta página foi deixada em branco propositadamente.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. História do Grupo Sovena

Nos finais do século XIX, pelas mãos de Alfredo da Silva, o maior industrial português, nasceu o primeiro grupo industrial, comercial e financeiro de Portugal - a Companhia União Fabril, CUF, fruto da fusão de duas pequenas empresas químicas, a União Fabril e a Companhia Aliança Fabril. No início do séc. XX, era o maior grupo português, com um complexo industrial no Barreiro representando o avanço tecnológico, o desenvolvimento empresarial e modernização institucional, abrangendo uma vasta área de negócios, desde construção naval, adubos, têxteis, ácidos a óleos alimentares. No entanto, devido à instabilidade social e política vivida em abril de 1974 causada pelo fim da ditadura em Portugal, ocorreu o fim da CUF. [4]

Nos finais do séc. XX e com o regresso da estabilidade social e política no país, Jorge de Mello e José Manuel de Mello levaram a cabo a reconstrução do grupo. Na década de 80 Jorge de Mello reentrou no mercado português pela aquisição da Sociedade Alco, Algodoeira Comercial e Industrial, e cuja área de negócio era a extração, refinação e embalagem de óleos alimentares. Na década de 90, seguem-se mais aquisições com o objetivo de reforçar a posição do grupo no mercado de óleos e azeites, tais como, a Lusol, cuja atividade consistia na extração e refinação de óleos e produção de sabões; a Tagol, responsável pela extração e refinação de oleaginosas e soja; e a Sovena, criada em 1956 por uma parceria entre a CUF, a Macedo e Coelho e a Sociedade Nacional de Sabões, para comercialização de óleos vegetais e sabões. [4]

A entrada no século XXI marcou o início da reestruturação industrial do grupo, com a concentração das atividades de extração na Tagol e de embalagem na Sovena, e de uma nova vaga de aquisições em prol da necessidade crescente de responder a um mercado global. Começou assim a internacionalização industrial do grupo. [4]

Por volta de 2005 ocorreu a aquisição de 80% do capital da *East Coast Olive Oil*, sendo o maior importador e embalador de azeite nos E.U.A, e ainda no mesmo ano, o grupo constituiu a Tagol Ibérica de Aceites em Espanha de modo a ser possível facilitar o acesso ao mercado de semente de girassol nesse país. O ano de 2008 foi marcado pela reestruturação e unificação da identidade e imagem do, até então, grupo Alco e respetivas empresas, passando este a denominar-se *Sovena Group*, com 4 unidades de negócio distintas (Biodiesel, Agriculture, Oilseeds e Consumer Goods). A SOVENA está englobada numa das 4 unidades de negócio da *Sovena Group*, mais especificamente na Consumer Goods. Devido à sua história e sua evolução, o Grupo é cada vez mais visto como uma referência no mercado global de azeite, estando presente em 7 países – Portugal, Espanha, EUA, Brasil, Angola, Tunísia e Marrocos.

2.2. Grupo Sovena

A fábrica da Sovena Portugal – Consumer Goods, situada no Barreiro, é o berço do Grupo Sovena. Atualmente é a maior fábrica de refinação e embalagem de óleos e azeites em Portugal. Efetua refinação, loteamento e embalagem de óleos vegetais e azeites.

São comercializados produtos que vão desde azeites a óleos vegetais passando por azeitonas, vinagres e sabões. Com operações fabris em Portugal, Espanha, USA e Tunísia e presença comercial no Brasil e Angola, esta área loteia, embala e comercializa, os produtos Sovena que abastecem os mais diversos mercados. [4]

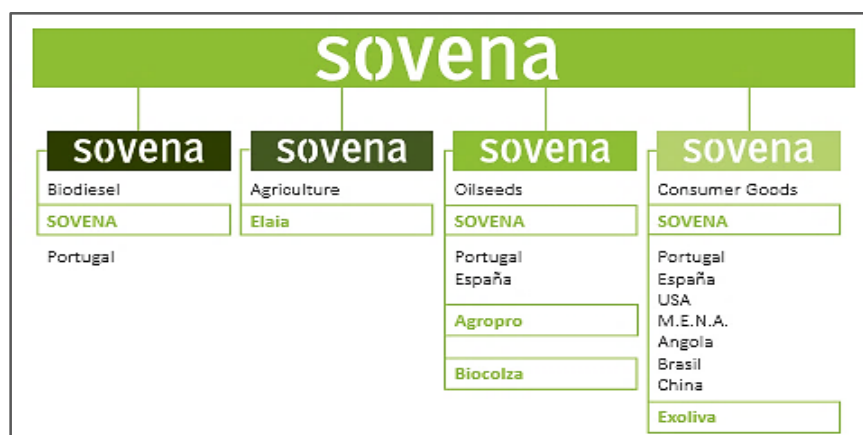


Figura 2.1 - Áreas de Negócio do GRUPO SOVENA.
Adaptado de [7].

2.3. Oleos Vegetais

2.3.1. A importância dos Oleos Vegetais

Por definição, os óleos vegetais consistem em gorduras líquidas à temperatura de 20 °C.

São gorduras extraídas de plantas: sementes, leguminosas e algumas frutas (sementes ou casca), das quais se pode obter óleo para usar nas mais diversas aplicações. [8]

Este tipo de óleo é uma fonte importante de vitaminas e ácidos gordos essenciais para uma alimentação variada e equilibrada. É no consumo de óleo que o organismo poderá encontrar os nutrientes que precisa, mas que não tem capacidade de produzir, e que nenhuma outra gordura tem em tão elevada quantidade. São também encontrados nos óleos vegetais, em menores quantidades, outro tipo de constituintes como os fitoesteróis com reconhecida ação benéfica na redução do colesterol. [4]

Atualmente existe uma grande variedade de óleos vegetais disponíveis para a preparação de alimentos. Para que se possa definir o mais indicado para consumo, alguns critérios devem ser levados em consideração: o sabor, as propriedades funcionais do produto, o preço e o impacto que ele pode causar na saúde. [8]

No que se refere ao setor alimentar, a qualidade dos óleos depende de diversos fatores associados a todos os estágios de produção, tais como, a escolha da matéria-prima, extração, refinação, loteamento e embalagem. A compra de sementes de qualidade, como girassol, soja ou colza é uma etapa crucial, uma vez que o tipo, o custo e a própria qualidade condicionam as restantes etapas. [4]

Processo de extração dos óleos [9]

Para a obtenção e tratamento das gorduras e óleos vegetais a partir de sementes ou frutos oleaginosos são admitidas as seguintes operações:

- I. Extração por processos físicos ou dissolução com solventes;
- II. Depuração mediante operações de decantação, filtração, centrifugação e desmucilaginação;
- III. Fracionamento por operações de arrefecimento ou aquecimento e ou por cristalização fracionada em dissolvente apropriado;
- IV. Refinação;
- V. Modificação molecular e de estrutura glicerídica.

Todas as operações descritas devem decorrer a temperaturas que não alterem a gordura ou o óleo.

Relativamente ao modo de obtenção, classificam-se:

- **Óleo bruto** – produto obtido por extração mecânica ou por dissolução por solvente.
- **Óleo refinado** – produto obtido pela refinação da gordura ou óleo bruto ou virgem.

No caso das sementes de baixo teor de gordura, como a soja, por exemplo, a sua extração é realizada recorrendo a um solvente de modo a obter o óleo cru. As sementes com elevado teor de gordura, como o girassol e a colza, o processo é similar, mas cerca de 70% do óleo cru é extraído por prensagem mecânica e o restante por solvente. [4]

2.3.2. Tipos de Óleos Vegetais

Óleo de Soja

O óleo de soja é de entre todos os óleos, o mais produzido em todo o mundo, sendo a principal fonte de óleo vegetal. Provém da semente de soja designada por *Glycina maxima*.

Uma semente de soja contém cerca de 20% de óleo, 40% de proteínas, 4.9% de cinzas e 33.9% de hidratos de carbono. [10]

Óleo de Girassol

O óleo de girassol é obtido a partir da semente da planta *Helianthus annuus L.* O óleo bruto é de cor âmbar claro, o óleo refinado é apresenta uma cor amarelo pálido. Corresponde apenas à quarta maior fonte de óleo vegetal. [11]

De cada semente de Girassol extraem-se 32% a 48% de gordura. [11]

Óleo de Colza

A colza é a segunda maior fonte de óleo vegetal.

Este tipo de óleo é obtido através das sementes com as seguintes designações: *Brassica napus L.*, *Brassica rapa L.* e *Brassica juncea L.* [12]

Relativamente à sua composição, é muito rico em ácidos gordos, tem um teor elevado de tocoferol e um baixo teor de ácidos gordos livres. [11]

Óleos de Amendoim e Milho

Embora estes dois tipos de óleos não tenham sido estudados neste trabalho, irá ser feita uma breve descrição destes óleos, dado que também são produzidos no Grupo Sovena.

Óleo de Milho

O óleo de milho encontra-se contido no germe ou embrião da semente que deriva da espécie *Zeamays L.* Cada semente contem apenas 3-5% de óleo. [12]

O óleo de milho bruto tem uma cor âmbar avermelhada mais escura do que outros óleos vegetais, que normalmente podem ser processados para um óleo de cor clara. [11]

A extração direta do óleo da semente é relativamente dispendiosa a nível industrial devido à baixa percentagem de óleo presente na semente.

Óleo de amendoim

O óleo de amendoim provém do fruto seco pertencente à espécie *Arachis hypogaea L.*, conhecida como “groundnut” dado que a semente se desenvolve no subsolo.

Cada semente contem naturalmente cerca de 47 a 50% de óleo, apresentado uma cor amarelo pálido.

Este tipo de óleo é principalmente usado para fritar, cozinhar, preparação de margarinas, entre outros. [10] [12]

As principais propriedades físicas dos óleos vegetais encontram-se na Tabela 2.1. [11]

Tabela 2.1 - Propriedades físicas dos óleos de soja, girassol, colza, milho e amendoim.

Propriedade	Óleo de soja	Óleo de girassol	Óleo de colza	Óleo de milho	Óleo de amendoim
Massa específica (25 °C) (g/cm ³)	0.9175	0.915-0.919	0.914-0.920	0.91875	0.910-0.915
Índice de refração, 25 °C	1.4728	1.472-1.475	1.470-1.474	1.470-1.474	1.467-1.470
Temperatura de fusão (°C)	-10; -16	-18; -20	-9	-10; -12	0-3.0

2.3.3. Composição dos Óleos Vegetais

Óleo de Soja

Relativamente à composição do óleo de soja, este é muito rico em Triacilglicerídeos e possui um teor relativamente elevado de Tocoferol, também conhecido como Vitamina E, sendo muito importante para a estabilidade do óleo. [10] [11]

A Tabela 2.2 exemplifica a composição típica de Ácidos gordos presente no óleo de soja. [10] [11]

Tabela 2.2 - Composição de Ácidos Gordos no óleo de soja.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Láurico	-	C12:0
Mirístico	0.1	C14:0
Palmítico	11.0	C16:0
Palmitoleico	0.1	16:1
Esteárico	4.0	C18:0
Oleico	23.4	C18:1
Linoleico	53.2	C18:2
Linolénico	7.8	C18:3
Araquídico	0.3	C20:0
Gadoleico	-	C20:1
Beênico	0.1	C22:0
Lignocérico	-	C24:0

Observando a Tabela 2.2, facilmente se conclui que o óleo de soja tem um alto teor de ácido linoleico e de ácido linolénico. [11]

Ambos os ácidos gordos são essenciais para a saúde humana e, de importância dietética, porém também são causa de instabilidade oxidativa do óleo. Por esse motivo, inúmeras técnicas têm sido utilizadas modo a alterar a composição de ácidos gordos com o intuito de melhorar as suas propriedades oxidativas ou funcionais. [10] [11]

Em relação à nomenclatura presente, a coluna da Tabela 2.2 referente à estrutura de cada ácido gordo, o primeiro valor corresponde ao número de átomos de carbono e o segundo valor refere-se ao número de ligações (simples, duplas ou triplas). Será adotada este tipo de nomenclatura

nas restantes tabelas referentes às composições para os outros tipos de óleos abordados anteriormente. [10] [11]

Óleo de Girassol

O óleo de girassol é rico em ácidos gordos, apresenta um alto teor de ácido linoleico e um teor muito reduzido de ácido linolénico. [11]

A Tabela 2.3 exemplifica a composição de Ácidos gordos no óleo de girassol (normal), apresentando um teor elevado de ácido linoleico (68.2%) e um teor muito baixo de ácido linolénico (0.5%).

Tabela 2.3 - Composição de Ácidos Gordos no óleo de girassol.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Láurico	0.5	C12:0
Mirístico	0.2	C14:0
Palmítico	6.8	C16:0
Palmitoleico	0.1	C16:1
Esteárico	4.7	C18:0
Oleico	18.6	C18:1
Linoleico	68.2	C18:2
Linolénico	0.5	C18:3
Araquídico	0.4	C20:0
Gadoleico	-	C20:1
Beênico	-	C22:0
Lignocérico	-	C24:0

De acordo com o teor de ácido oleico (C18:1), o óleo de girassol pode ser dividido em três categorias: óleo de girassol normal, alto oleico e médio oleico. [12]

A composição de ácido oleico no óleo de girassol alto oleico situa-se entre 75-90.7%, no caso do óleo de girassol médio oleico situa-se entre 43-71.8%. A composição do óleo de girassol normal corresponde à Tabela 2.3. [12]

Óleo de Colza

Tal como a soja, o óleo de colza é muito rico em Triacilglicerídeos e também possui um teor relativamente elevado de Tocoferol. [10] [11]

A Tabela 2.4 exemplifica a composição dos ácidos gordos presentes no óleo de colza. [10] [11]

Tabela 2.4 - Composição de Ácidos Gordos no óleo de colza.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Láurico	-	C12:0
Mirístico	0.1	C14:0
Palmítico	4.1	C16:0
Palmitoleico	0.2	C16:1
Esteárico	1.9	C18:0
Oleico	61.6	C18:1
Linoleico	21.0	C18:2
Linolénico	8.8	C18:3
Araquídico	0.6	C20:0
Gadoleico	1.0	C20:1
Beênico	0.2	C22:0
Lignocérico	0.2	C24:0

Óleo de milho

Em relação á sua composição, observando a Tabela 2.5 o óleo de milho é rico em ácidos gordos insaturados, como é o caso do ácido linolénico que contem cerca de 34.0-62.0% da sua composição. A Tabela 2.5 exemplifica a composição de ácidos gordos do óleo de milho. [11]

Tabela 2.5 - Composição de Ácidos Gordos no óleo de milho.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Láurico	<0.3	C12:0
Mirístico	0.1	C14:0
Palmítico	8.0-19.0	C16:0
Palmitoleico	<0.5	C16:1
Esteárico	2.0	C18:0
Oleico	19.0-50.0	C18:1
Linoleico	34.0-62.0	C18:2
Linolénico	<2.0	C18:3
Araquídico	0.3-1.0	C20:0
Gadoleico	<1.0	C20:1
Beênico	<0.5	C22:0
Lignocérico	<0.5	C24:0

Óleo de amendoim

O óleo de amendoim contém uma elevada proporção de ácidos gordos insaturados, nomeadamente o ácido oleico e linoleico (C18:1 e C18:2).

Quando a semente emadurece, o teor de ácido oleico aumenta e o ácido linoleico diminui, melhorando a estabilidade oxidativa do óleo.

A Tabela 2.6 exemplifica a composição de ácidos gordos do óleo de amendoim. [11]

Tabela 2.6 - Composição de Ácidos Gordos no óleo de amendoim.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Palmítico	7.4-12.5	C16:0
Esteárico	2.7-4.9	C18:0
Oleico	41.3-67.4	C18:1
Linoleico	13.9-35.4	C18:2
Araquídico	1.2-1.9	C20:0
Beênico	2.1-3.6	C22:0
Lignocérico	0.9-1.7	C24:0

2.4. Azeite

2.4.1. A importância do Azeite

O azeite é utilizado há milhares de anos, sobretudo pelos povos mediterrânicos, que cedo se aperceberam da sua riqueza alimentar e dos benefícios que podiam retirar do seu consumo. [4]

É uma gordura saudável, composta por ácidos gordos, vitamina E e nutrientes essenciais para uma alimentação completa e saudável. Ao contrário dos óleos, não é extraído de sementes, mas sim obtido por processos mecânicos, como a maceração e esmagamento das azeitonas, que libertam o azeite contido nos tecidos vegetais das azeitonas. Obtém-se assim uma pasta que é posteriormente prensada e decantada para a obtenção de azeites virgem ou virgem extra. [4]

O azeite virgem é obtido a partir dos frutos da oliveira (*Olea europaea*) por meios mecânicos ou outros meios físicos, em condições que não causem quaisquer alterações no óleo. É a única gordura vegetal que pode ser consumida crua. [9]

O seu processo de extração mantém todas as suas propriedades e componentes, fazendo do azeite um alimento saudável, que contribui para o equilíbrio do organismo. Devido aos seus benefícios, o seu consumo tem aumentado bastante, sobretudo nos segmentos de maior qualidade, como os virgens extras. [4] [9]

A cor, cheiro e sabor do azeite, tornam-no num componente imprescindível, sendo a única gordura que não regista modificações substanciais da sua estrutura quando submetido a uma temperatura de 200 °C [9]

Dos processos de extração em contínuo é aproveitado o seu subproduto – **bagaço de azeitona**.

Processo de extração do azeite [9]

Na extração e depuração do azeite são admitidas as seguintes operações tecnológicas:

- I. Lavagem e moenda da azeitona;
- II. Batedura e aquecimento da massa;
- III. Extração apenas por processos físicos de ação mecânica e de tensão superficial;
- IV. Depuração, mediante operações de decantação, lavagem, filtração e centrifugação.

O esquema referente ao processo de extração do azeite encontra-se no Anexo A.

O azeite pode ser refinado de acordo com as seguintes operações:

- a) Desacidificação, através da neutralização dos ácidos gordos livres com soluções alcalinas ou por destilação seletiva utilizando um solvente adequado;
- b) Descoloração com adsorventes inertes ou membranas;
- c) Desodorização, pela passagem de vapor de água ou outros gases inertes, em ambiente rarefeito.

Os azeites que não integram as categorias virgem nem virgem extra são sujeitos á refinação que inclui as operações descritas anteriormente.

São neutralizados e desodorizados suavizando-lhes o sabor e a cor. Estes azeites são posteriormente combinados com azeites virgens ou virgens extra para a criação do que legalmente se chama de “Azeite- Tipo Azeite”. [4]

A Tabela 2.7 exemplifica alguns dos valores típicos relativamente às propriedades físicas do azeite. [11] [13]

Tabela 2.7 - Propriedades físicas do azeite.

Propriedade	Valor
Massa específica (25 °C) (g/cm ³)	0.909 – 0.915
Índice de refração, 25 °C	1.4680 – 1.4705
Calor específico (Cp) (J/g. °C)	2
Viscosidade (cP)	84
Temperatura de ebulição (°C)	300
Temperatura de fusão (°C)	2; -6

2.4.2. Categorias de Azeite

O azeite pode ser classificado em vários tipos, sendo o grau de acidez o parâmetro mais conhecido e importante para avaliar a qualidade do azeite. [14]

Porém a acidez não está diretamente relacionada com o seu sabor, mas sim com o estado fitossanitário das azeitonas, sendo consequência, entre outros, das azeitonas não estarem em perfeitas condições quando são laboradas ou do mau armazenamento. [14]

O sabor, cheiro e cor são características organoléticas e dependem essencialmente dos componentes presentes na azeitona e que são extraídos com o próprio azeite.

O azeite pode ser classificado em diferentes categorias: [9] [14]

- **Azeite Virgem:** Azeite de boa qualidade, com sabor e cheiro a azeitona sã. Acidez igual ou inferior a 2%. Tem uma qualidade relativamente inferior ao do virgem extra.

- **Azeite Virgem Extra:** Azeite de qualidade superior, com sabor e cheiro intensos a azeitona sã. Não apresenta nenhum defeito organolético.
A sua acidez, expressa em ácido oleico, é igual ou inferior a 0.8%.
É um tipo de Azeite que não sofre processos de refinamento e é considerado apto para o consumo direto.

- **Azeite:** Contém azeite refinado e azeite virgem. Trata-se de um azeite refinado, enriquecido com azeite virgem, aromático e frutado. O seu grau de acidez é igual ou inferior a 1,0%.

- **Azeite lampante:** consiste num azeite virgem com acidez, expressa em ácido oleico, superior a 2%. É considerado impróprio para consumo.

Os azeites virgens (virgem e virgem extra) são obtidos somente por processos mecânicos em condições térmicas que não alterem as suas propriedades. Não são submetidos a refinação.

2.4.3. Composição do Azeite

O azeite é principalmente composto por Triacilglicerídeos (~ 99%) e secundariamente por ácidos gordos livres, mono- e diacilglicerídeos. Apresenta uma grande quantidade de compostos fenólicos e voláteis. Alguns destes compostos contribuem para o carácter único do azeite. [15] Pode ser dividido em duas frações: a fração saponificável, podendo também ser designada por fração maioritária; a fração não saponificável ou minoritária. [10]

A fração saponificável, que representa cerca de 99% do azeite, é constituída por triacilglicerídeos, diacilglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos gordos livres e quantidades pequenas de fosfolípidos, ceras e glicósidos. [10]

A concentração de diacilglicerídeos varia entre 1% a 2.8% e para os monoglicerídeos é menor do que 0.25%. [10]

A Tabela 2.8 exemplifica a composição dos vários Triacilglicerídeos presentes no azeite. [10] [11]

Tabela 2.8- Composição de Ácidos Gordos no Azeite.

Ácido gordo	Composição (%)	Estrutura
Láurico	Traços	C12:0
Mirístico	<0.1	C14:0
Palmítico	7.5-20.0	C16:0
Palmitoleico	0.3-3.5	C16:1
Heptadecanóico	<0.3	C17:0
Heptadecenóico	<0.3	C17:1
Esteárico	0.5-5.0	C18:0
Oleico	55.0-83.0	C18:1
Linoleico	3.5-21.0	C18:2
Linolénico	<0.9	C18:3
Araquídico	<0.6	C20:0
Beênico	<0.2	C22:0
Erúcico	Traços	C22:1
Lignocérico	<0.2	C24:0

Relativamente à fração não saponificável, correspondendo a 0.5% - 1.5% do azeite, esta é constituída: hidrocarbonetos; álcoois gordos; compostos fenólicos; compostos voláteis; pigmentos (clorofila e carotenóides); tocoferóis e esteróis. [10]

Os tocoferóis, como é o caso da vitamina E, contribui para a estabilidade do azeite. No caso dos hidrocarbonetos, encontra-se em maior quantidade o esqualeno.

Os esteróis são lípidos importantes relacionados à qualidade do óleo e amplamente utilizados para verificar a sua genuinidade. [15]

A Tabela 2.9 exemplifica a composição dos esteróis no azeite. [11] [15]

Tabela 2.9 - Composição típica de esteróis no azeite.

Esterol	(%)
Campesterol	≤ 0.4
Estigmasterol	≤ Campesterol
Colesterol	<0.5
β- Sitoesterol	0.75-0.90
Δ-7-Estigmastenol	≤ 0.4

2.5. Métodos de Análise de Referência – Óleos Vegetais

Para se realizar uma análise qualitativa e quantitativa dos óleos vegetais, são realizados testes de acordo com as Normas ISO aplicáveis a cada parâmetro. A série de Normas ISO foram criadas pela Organização Internacional de Padronização (ISO), com o objetivo de melhorar a qualidade de produtos e serviços. [16]

2.5.1. Acidez

Objetivo: Determinar a percentagem de ácidos gordos livres (expresso em % de ácido oleico) presente no óleo. Podendo também ser apresentado como um índice de acidez em miligramas de hidróxido de potássio necessário para a neutralização dos ácidos gordos livres presentes em um grama de óleo.

Corresponde a uma medida dos ácidos gordos livres contidos no óleo, dado que estes resultam da hidrólise dos glicerídeos que se encontram presentes no óleo.

Norma aplicável: ISO 660.

Princípio: A amostra é dissolvida numa mistura de solventes adequados e os ácidos presentes são titulados com um hidróxido de potássio (KOH) ou hidróxido de sódio (NaOH). Determina-se a percentagem de ácidos gordos livres presentes na amostra e o resultado é apresentado como uma percentagem de ácido oleico livre.

Procedimento: Pesar cerca de 5-10 gramas de amostra num erlenmeyer de 250 ml, dado que o valor da toma de amostra varia consoante o índice de acidez pretendido.

De seguida dissolver com 100 ml de etanol, juntar 1 ml de indicador fenolftaleína e, titular, com aquecimento e agitação com hidróxido de potássio.

Para apresentar o resultado em índice de acidez:

$$\text{Índice de Acidez} = \frac{56,1 \times V \times c}{m} \quad \text{Eq. 1}$$

O grau de acidez em percentagem de ácido oleico é calculado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{Grau de Acidez} = \frac{V \times c \times M \times 100}{1000 \times m} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde,

V: Volume, em ml, da solução de hidróxido de potássio utilizada;

c: Concentração, em moles por litro, da solução de hidróxido de potássio utilizada;

M: Peso molecular, em gramas por mole, do ácido em que se expressa a acidez;

m: Peso em gramas de amostra.

Especificações: Acidez até 4 % para os óleos brutos e até 0.1 % para óleos refinados.

2.5.2. Índice de Peróxidos

Objetivo: Determinar a quantidade de peróxidos presentes no óleo, em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de amostra, sendo medido através da quantidade de iodo libertado do iodeto de potássio (KI).

Avaliar o estado de oxidação de um óleo, visto que os hidroperóxidos são os produtos primários da oxidação do óleo.

Norma aplicável: ISO 3960.

Princípio: Tratamento da amostra em estudo, dissolvida em ácido acético e iso-octano, com uma solução de iodeto de potássio. Titulação do iodo libertado com uma solução padrão de tiossulfato de sódio.

Reagentes: Iso-octano e ácido acético glacial puro, isentos de oxigénio; Soluções aquosas de tiossulfato de sódio de 0,01 N; Solução aquosa, saturada de iodeto de potássio, isenta de iodo e iodatos; Solução indicadora de amido de 1 por 100 em água destilada.

Procedimento: Colocar a amostra num erlenmeyer de 250 ml e com tampa, seco com gás inerte. Dissolver a amostra com 50 ml da solução iso-octano/ácido acético com agitação.

De seguida, juntar cerca de 0.5 ml de iodeto de potássio diluído.

Agitar levemente durante 1 minuto, juntar 100 ml de água desmineralizada e agitar vigorosamente.

Após o último passo proceder à titulação com a solução de tiossulfato de sódio de 0,01 N, usando cerca de 0,5 ml do indicador de amido.

Paralelamente ao procedimento anterior, efetuar o mesmo ensaio, mas numa amostra sem óleo. O índice deverá dar 0.

Para o cálculo do índice de peróxidos recorre-se à fórmula apresentada:

$$I.P = \frac{(V-V_o) \cdot c \cdot F \cdot 1000}{m} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde,

V: Tiossulfato consumido na titulação, expresso, em mililitros;

Vo: Tiossulfato consumido na titulação da amostra em branco (ml);

c: Concentração da solução de tiossulfato, expressa, em moles por litro.

m: Peso da amostra em gramas.

F: Fator da solução de tiosulfato de sódio.

Especificações:

Tabela 2.10 - Limites de Índice de Peróxidos nos óleos vegetais.

Índice de peróxidos (meq O_2 /kg)	
≤ 10	Limite de Especificação
≤ 2	Limite à data de embalagem

2.5.3. Índice de Anisidina

Objetivo: Determinar a quantidade de aldeídos presentes no óleo, principalmente aldeídos α , β aldeídos insaturados. Os aldeídos são considerados produtos secundários da oxidação fornecendo um sabor forte e desagradável ao óleo.

Norma Aplicável: ISO 6885.

Princípio: Preparação de uma solução de ensaio com o solvente iso-octano. A solução irá reagir com uma solução do reagente p-anisidina em ácido acético.

O índice de anisidina é expresso como cem vezes a absorvância da solução de 1 g de óleo em 100 ml de iso-octano e do reagente p-anisidina, sendo medida no comprimento de onda 350 nm e numa célula de 10 mm.

Reagentes: Solvente iso-octano; Solução de ácido acético glacial; reagente p-anisidina (4-Methoxyaniline).

Procedimento: Dissolver a amostra de óleo em iso-octano, cerca de 5 ml a 10 ml de solvente.

Após a dissolução da amostra, encher dois tubos de ensaio com a solução anterior. Ao primeiro tubo juntar p-anisidina e ao segundo juntar o ácido acético. Agitar os dois tubos e colocar no escuro durante 8 minutos.

De seguida, medir as absorvâncias a 350 nm, do primeiro tubo de ensaio (A_1) e depois do segundo tubo de ensaio (A_0).

Por último, juntar num terceiro tubo de ensaio iso-octano e p-anisidina, agitar, manter no escuro durante 8 minutos e medir a absorvância a 350 nm (A_2).

O índice de anisidina é calculado de acordo com a fórmula apresentada:

$$A.V = \frac{100QV \times [1.2(A_1 - A_2 - A_0)]}{m} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde,

Q: Conteúdo da amostra da solução medida baseada no que o índice de anisidina é expresso, em gramas por mililitro ($Q = 0.01 \text{ g/ml}$);

V: Volume em que foi dissolvida a amostra, em mililitros ($V = 25 \text{ ml}$);

A_1 : Absorvância da solução que reagiu;

A_2 : Absorvância do branco;

A_0 : Absorvância da solução que não reagiu;

1.2: Fator de correção para a diluição da primeira solução;

m: Massa da amostra de óleo em gramas.

Especificações: O valor do índice de anisidina é de 10, no caso do óleo de girassol refinado.

2.5.4. Absorvâncias no UV

Objetivo: Determinação espectrofotométrica das absorvâncias nos comprimentos de onda de 230 (dienos) e de 270 (trienos) nanómetros, normalmente designados por K_{230} e K_{270} .

Os hidroperóxidos formam dienos conjugados, sendo estes produtos de oxidação primária no óleo.

Norma Aplicável: NP 970.

Princípio: Dissolver uma amostra no solvente estabelecido e mede-se a absorvância da solução em relação ao solvente puro, nos comprimentos de onda prescritos. Calculam-se as extinções específicas numa célula de 10 mm.

Reagentes: Solvente iso-octano.

Procedimento: Pesar num balão de 25 ml cerca de 0,05 g da amostra, isenta de impurezas e perfeitamente homogénea. De seguida afere-se o balão com o solvente indicado e agita-se até homogeneizar. Coloca-se numa célula de quartzo a solução obtida anteriormente e medem-se os coeficientes de extinção.

Os coeficientes de extinção registados nos comprimentos de onda calculam-se da seguinte forma:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

K_{λ} : Coeficiente de extinção específico no comprimento de onda λ ;

E_{λ} : Absorvância lida no comprimento de onda λ ;

c: Concentração da dissolução em g/100 ml;

s: Percurso ótico em cm.

Especificações: Para os óleos os valores das absorvâncias nos comprimentos de onda 230 e 270 são, respetivamente, 7.0 e 2.0.

2.5.5. Composição em Ácidos Gordos

Objetivo: Determinação da percentagem dos vários tipos de ácidos gordos presentes no óleo, desde os menores de C14 a C24, incluindo os C18-trans. É importante saber a composição dos ácidos gordos presentes no óleo, dado que alguns ácidos gordos têm influência na estabilidade oxidativa do óleo.

Norma aplicável: ISO 12966-2/Parte 2.

Princípio: Os óleos são predominantemente compostos por ésteres de ácidos gordos de glicerol (triacilgliceróis), com menor quantidade de ésteres de ácidos gordos de esteróis e álcoois alifáticos de cadeia longa. Devido à elevada massa molecular dos TAGs e sua consequente baixa volatilidade, são difíceis de analisar diretamente por cromatografia gasosa (GC). Por conseguinte, a melhor prática é a formação ésteres de ácidos gordos, normalmente os ésteres metílicos de ácidos gordos.

O método baseia-se na separação e determinação por Cromatografia Gás-Líquido dos ésteres metílicos dos ácidos gordos. A fase móvel é um gás, normalmente o hélio ou o hidrogénio, para arrastar pela coluna aquecida, os ésteres metílicos dos ácidos gordos ou triglicerídeos esterificados. Os componentes da mistura são eluídos com o gás e detetados à saída da coluna. Devido à interação diferente com os diversos compostos, estes eluem em tempos diferentes, constituindo cada um deles o tempo de retenção do composto em causa para a série de parâmetros analíticos considerados. O composto é identificado através da comparação do tempo de retenção correspondente.

Como detetor é usado o Detetor de Ionização de Chama.

Procedimento:

1. Preparação dos ésteres metílicos.

Colocar 350 mg de óleo limpo (filtrado) num erlenmeyer de 50 ml, adicionar 6 ml de uma solução de 0,5 N de hidróxido de sódio metanólico, 7 ml de trifluoreto de boro e reguladores de ebulição.

De seguida ligar o erlenmeyer a um condensador, aquecer sobre refluxo até as gotas desaparecerem (5-10 minutos). Adicionar trifluoreto de boro pelo topo do condensador e

continuar o aquecimento por 2 minutos. Adicionar 2-5 ml de heptano na mistura pelo topo do condensador.

Remover a fonte de calor e o respetivo condensador. Adicionar uma pequena quantidade de uma solução de hidróxido de sódio saturado no erlenmeyer até o nível do líquido atingir o “pescoço do erlenmeyer”. Transferir cerca de 1 ml da camada superior (solução de heptano) para um tubo de ensaio e adicionar anidrido de sulfato de sódio para efetuar a remoção de traços de água.

A solução final terá cerca de 5-10 % de ésteres metílicos e pode ser injetada na coluna de cromatografia.

2. Configuração do cromatógrafo.

A configuração do cromatógrafo deve ser efetuada de acordo com os seguintes parâmetros: Temperatura da coluna (185 °C) e Temperatura do detetor (200 °C).

3. Injeção da amostra e leitura dos picos obtidos para identificação da composição em percentagem dos vários ácidos gordos.

Injetar cerca de 0.1-2 µl da amostra para analisar e obter as leituras. A partir do cromatograma, divide-se a área correspondente a um determinado composto pelo somatório de todas as áreas e obtém-se a composição em percentagem dos vários ácidos gordos.

Especificações:

A Tabela 2.11 exemplifica a composição de ácidos gordos para os três principais tipos de óleos, recomendada pelo *Codex Alimentarius STAN 210*. [12]

Tabela 2.11 - Composição típica de Ácidos Gordos nos óleos vegetais.

Ácidos Gordos (%)	Soja	Girassol	Girassol (alto oleico)	Girassol (médio oleico)	Colza
C12:0	ND-0.1	ND-0.1	ND	ND	ND
C14:0	ND-0.2	ND-0.2	ND-0.1	ND-1	ND-0.2
C16:0	8.0-13.5	5.0-7.6	2.6-5.0	4.0-5.5	1.5-6.0
C16:1	ND-0.2	ND-0.3	ND-0.1	ND-0.05	ND-3.0
C17:0	ND-0.1	ND-0.2	ND-0.1	ND-0.05	ND-0.1
C17:1	ND-0.1	ND-0.1	ND-0.1	ND-0.06	ND-0.1
C18:0	2.0-5.4	2.7-6.5	2.9-6.2	2.1-5.0	0.5-3.1
C18:1	17-30	14.0-39.4	75-90.7	43.1-71.8	8.0-60.0
C18:2	48.0-59.0	48.3-74.0	2.1-17	18.7-45.3	11.0-23.0
C18:3	4.5-11.0	ND-0.3	ND-0.3	ND-0.5	5.0-13.0
C20:0	0.1-0.6	0.1-0.5	0.2-0.5	0.2-0.4	ND-3.0
C20:1	ND-0.5	ND-0.3	0.1-0.5	0.2-0.3	3.0-15.0
C20:2	ND-0.1	ND	ND	ND	ND-1.0
C22:0	ND-0.7	0.3-1.5	0.5-1.6	0.6-1.1	ND-2.0
C22:1	ND-0.3	ND-0.3	ND-0.3	ND	>2.0-60.0
C22:2	ND	ND-0.3	ND	ND-0.09	ND-2.0
C24:0	ND-0.5	ND-0.5	ND-0.5	0.3-0.4	ND-2.0
C24:1	ND	ND	ND	ND	ND-3.0

ND- Não detetável ($\leq 0.05\%$)

2.5.6. Outros parâmetros de Análise

▪ Cor Lovibond (Igualmente aplicável ao azeite)

Objetivo: Determinação do número correspondente a uma cor padrão na escala de Lovibond de óleos e gorduras de origem vegetal.

Norma aplicável: ISO 15305.

Princípio: Comparação da cor da luz transmitida, através de determinada espessura de óleo, com a cor, da luz da mesma fonte, transmitida através de padrões de vidro colorido. Os resultados são, convencionalmente, expressos em unidades Lovibond.

▪ Humidade (Igualmente aplicável ao azeite)

Objetivo: Determinar a percentagem de água presente no óleo., dado que pode provocar reações de hidrólise e consequentemente o aumento da quantidade de ácidos gordos livres.

Norma aplicável: ISO 662.

Princípio: Aquecimento de uma porção de amostra ensaio a 103°C até que a humidade e as substâncias voláteis sejam completamente eliminadas, procedendo depois à determinação da perda de massa.

▪ Índice de Iodo

Objetivo: Calcular a quantidade de iodo adsorvido em gramas por 100 gramas de óleo, determinada pelo uso da solução de Wijs. Permite a indicação do grau de insaturação do óleo.

Norma aplicável: ISO 3961

Princípio: Dissolução de uma amostra de óleo em tetracloreto de carbono. Posteriormente a amostra dissolvida é tratada com um excesso conhecido de uma solução de iodocloreto em ácido acético glacial (Reagente de Wijs).

2.6. Métodos de Análise de Referência- Azeite

De modo a efetuar uma análise qualitativa e quantitativa dos azeites, são realizados testes de acordo com o Regulamento Comunitário (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de julho de 1991 com as respetivas alterações, nomeadamente, a última alteração de acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 de 2015. [17]

Segundo o regulamento, são analisados os parâmetros mais importantes para a qualidade do azeite, identifica-se os vários tipos de azeite de acordo com as características de cada um obedecendo aos critérios de qualidade e pureza. [17]

2.6.1. Acidez

Objetivo: Determinar a percentagem de ácidos gordos livres (expresso em % de ácido oleico) presente no azeite.

Corresponde a uma medida dos ácidos gordos livres contidos no azeite, dado que estes resultam de reações de hidrólise dos triacilglicerídeos. A sua quantidade influencia o grau de acidez do azeite e a sua classificação.

Norma Aplicável: Regulamento (CEE) nº 2568/91 Anexo II.

Princípio: Dissolução da amostra numa mistura de solventes, seguida de titulação dos ácidos gordos livres presentes com uma solução etanólica de hidróxido de potássio.

Reagentes: Solução de indicador de fenolftaleína; Solução de hidróxido de potássio de 0,1 N ou 0,5 N; Solução de éter etílico e etanol (solução etanólica, 1:1).

Procedimento: Pesar numa balança analítica uma toma de ensaio (10-20 g), para um balão de Erlenmeyer de 250 ml. Colhem-se as tomas de ensaio, de acordo com o índice de acidez presumido, como se encontra apresentado na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 - Toma de ensaio de acordo com o Índice de Acidez.

Índice de acidez presumido	Peso da toma de ensaio (g)	Precisão da pesagem da toma de ensaio
<1	20	0,05
1 – 4	10	0,02
4 – 15	2,5	0,01
15 – 75	0,5	0,001
> 75	0,1	0,0002

De seguida dissolver com 100 ml de solução etanólica, juntar 1 ml do indicador de fenolftaleína, titular com aquecimento, agitando continuamente com hidróxido de potássio (KOH), até observar a viragem do indicador para a cor carmim.

Para determinar a percentagem de acidez, em percentagem de ácido oleico, utiliza-se a equação:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde,

V: Volume consumido, expresso em mililitros, de solução titulada de hidróxido de potássio.

c: Concentração, em moles por litro, da solução titulada de hidróxido de potássio utilizada.

M: Massa molar, em gramas por mole, do ácido em que se expressa a acidez (M= 282 no caso do ácido oleico).

m: Peso em gramas, da toma de ensaio.

Especificações:

Tabela 2.13 - Valor da Acidez de acordo com o tipo de azeite

Tipo de azeite	Acidez (%)
Azeite	≤ 0.3
Azeite virgem	≤ 0.8
Azeite virgem extra	0.8 - 2
Azeite refinado	≤ 1

2.6.2. Índice de Peróxidos

Objetivo: Determinação da quantidade de peróxidos formados no azeite, expresso em miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de amostra, capazes de oxidar o iodeto de potássio (KI). Permite avaliar o estado de oxidação do azeite, sendo uma boa aproximação no início da oxidação, pois os hidroperóxidos são produtos da oxidação dos ácidos gordos insaturados.

Norma Aplicável: Regulamento (CEE) nº 2568/91 Anexo III.

Princípio: Tratamento da amostra em estudo, dissolvida em ácido acético e clorofórmio, com uma solução de iodeto de potássio. Titulação do iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio.

Procedimento: Pesar numa balança analítica a amostra e de seguida colocar, rapidamente, num frasco de 250 ml com tampa, seco com gás inerte. Se for esperado obter um índice entre 0 a 12, a amostra deve ser de 2 a 5 gramas.

De seguida, dissolver a amostra com 10 ml de clorofórmio e depois com cerca de 15 ml de ácido acético, ambos rapidamente e com agitação. Depois adicionar 1 ml de iodeto de potássio.

Tapar, rapidamente, agitar durante 1 minuto, e deixar o frasco durante exatamente 5 minutos na ausência de luz. Após o tempo indicado juntar 100 ml de água e agitar.

Titular o iodo, com a solução de tiosulfato de sódio de 0,01 N, usando o indicador de amido.

Paralelamente efetua-se um ensaio em branco, sem amostra, o índice deverá dar 0.

O Índice de Peróxidos determina-se pela equação:

$$I.P = \frac{(V-V_0) \times N \times 1000}{m} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde,

V: Tiosulfato consumido na titulação (ml); V₀: Tiosulfato consumido na titulação da amostra em branco (ml).

N: Normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio.

m: Peso da amostra (g).

Especificações: Para o azeite virgem extra e azeite virgem aceitam-se valores até 20. Para azeite refinado até 5 e para azeite (contendo azeite virgem e refinado) até 15.

2.6.3. Absorvâncias no UV

Objetivo: Determinar o conteúdo de ácidos gordos polinsaturados isomerizados, ou seja, dienos e trienos conjugados. Fornece indicações sobre a qualidade de uma matéria gorda nomeadamente no que diz respeito ao estado de conservação e modificações que tenham ocorrido durante o processo tecnológico.

O resultado é normalmente apresentado com o valor dos coeficientes de extinção no UV, nos comprimentos de onda de 232 (dienos) e de 272 (trienos) nanómetros.

Norma Aplicável: Regulamento Comunitário (CEE) nº 2568/91/Anexo IX.

Princípio: Dissolve-se uma amostra no solvente estabelecido e mede-se a absorvância da solução em relação ao solvente puro, nos comprimentos de onda prescritos. Calculam-se as extinções específicas a 232 nm e 268 nm em iso-octano ou a 232 nm e 270 nm em ciclo-hexano, numa célula de 10 mm.

Reagentes: Solvente Iso-octano.

Procedimento: Pesar num balão de 25 ml cerca de 0,25 g da amostra, ou seja, isenta de impurezas e perfeitamente homogénea. Deve-se obter uma solução perfeitamente límpida. De seguida afere-se o balão com o solvente indicado e agita-se até homogeneizar. Coloca-se numa célula de quartzo a solução obtida anteriormente e medem-se os coeficientes de extinção.

Os coeficientes de extinção registrados nos comprimentos de onda calculam-se da seguinte forma:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \cdot s} \quad \text{Eq. 8.}$$

Onde:

K_{λ} : Coeficiente de extinção específico no comprimento de onda λ ;

E_{λ} : Absorvância lida no comprimento de onda λ ;

c : Concentração da dissolução em g/100 ml;

s : Percurso ótico em cm.

Para o azeite, também se calcula o valor de ΔK (variação da extinção específica):

$$\Delta K = \left| K_m - \left(\frac{K_{\lambda m}^{-4} + K_{\lambda m}^{+4}}{2} \right) \right| \quad \text{Eq. 9}$$

k_m : Coeficiente de extinção específico no comprimento de onda m (270 nm ou 268 nm).

Especificações:

Tabela 2.14 - Valor de K270 e K232 para cada tipo de azeite

Tipo de azeite	K270	K232
Azeite	≤ 0.9	-
Azeite virgem	≤ 0.25	≤ 2.60
Azeite virgem extra	≤ 0.22	≤ 2.50

Tabela 2.15 - Valor de ΔK para cada tipo de azeite.

Tipo de azeite	ΔK
Azeite	≤ 0.15
Azeite virgem	≤ 0.01
Azeite virgem extra	≤ 0.01

2.6.4. Composição em Ácidos Gordos

Objetivo: Determinação por cromatografia em fase gasosa de ácidos gordos livres e ligados dos triacilgliceróis no azeite, após conversão dos ácidos em ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME).

Obtém-se a percentagem dos diversos tipos de ácidos gordos presentes no azeite, desde os menores de C14 a C24, incluindo os C18-trans.

É importante saber a composição dos ácidos gordos presentes no azeite, dado que alguns ácidos gordos têm influência na estabilidade oxidativa.

Norma Aplicável: Regulamento Comunitário (CEE) nº 2568/91/Anexos XA e XB e alterações de acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 de 2015 / Anexo X.

Princípio: O método baseia-se na separação e determinação por Cromatografia Gás-Líquido dos ésteres metílicos dos ácidos gordos. A preparação dos ésteres é realizada de acordo com a parte A. As condições analíticas são descritas na parte B.

A fase móvel é um gás, normalmente o hélio ou o hidrogénio, para arrastar pela coluna aquecida, os ésteres metílicos dos ácidos gordos ou triglicerídeos esterificados. À medida que percorrem a coluna capilar, os compostos volatilizados em análise interagem com a fase estacionária que reveste a superfície interior da coluna. Devido à interação diferente com os diversos compostos, estes eluem em tempos diferentes, constituindo cada um deles o tempo de retenção do composto em causa para a série de parâmetros analíticos considerados. O composto é identificado através da comparação do tempo de retenção correspondente.

O detetor utilizado é o Detetor de Ionização de Chama.

Procedimento:

Idêntico ao método aplicado aos óleos vegetais segundo a norma ISO 5508. A principal diferença é a preparação dos ésteres metílicos para o azeite.

São recomendados os dois métodos seguintes para a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do azeite.

Método A: Transesterificação a frio por meio de uma solução metanólica de hidróxido de potássio.

Método B: Metilação a quente por meio de uma solução metanólica de metóxido de sódio, seguida de uma esterificação em meio ácido.

A escolha do método dependerá do parâmetro analítico a determinar e da categoria do azeite.

O método A é utilizado para os seguintes azeites:

- Azeites virgens com acidez livre inferior a 3,3 %;
- Azeite refinado;
- Azeite (lote de azeites virgens com azeite refinado);
- Óleo de bagaço de azeitona refinado;

- Óleo de bagaço de azeitona (lote de azeites virgens com óleo de bagaço de azeitona refinado).

O método B é utilizado para os seguintes azeites:

- Azeite virgem com acidez livre superior a 3,3 %;
- Óleo de bagaço de azeitona bruto.

Especificações:

A Tabela 2.16 exemplifica a gama de valores para a composição dos Ácidos gordos no azeite virgem e refinado, de acordo com o *Codex Alimentarius STAN 033*. [18]

Tabela 2.16 - Composição de Ácidos Gordos nos azeites virgem e refinado.

Ácidos Gordos (%)	Azeite Refinado	Azeite Virgem
C14:0	0.0-0.05	0.0-0.05
C16:0	7.5-20.0	7.5-20.0
C16:1	0.3-3.5	0.3-3.5
C17:0	0.0-0.3	0.0-0.3
C17:1	0.0-0.3	0.0-0.3
C18:0	0.5-5.0	0.5-5.0
C18:1	55.0-83.0	55.0-83.0
C18:2	3.5-21.0	3.5-21.0
C20:0	0.0-0.6	0.0-0.6
C20:1	0.0-0.4	0.0-0.4
C22:0	0.0-0.2	0.0-0.2
C24:0	0.0-0.2	0.0-0.2
C18:1 trans	0.0-0.20	0.0-0.05
C18:2 trans+C18:3 trans	0.0-0.30	0.0-0.05

2.6.5. Composição em Esteróis

Objetivo: Determinar do teor de esteróis, simples e totais, do azeite. Proporciona informação sobre a identidade do azeite. O β -Sitoesterol é o esteroide em maior quantidade no azeite, enquanto o Estigmasterol e o Campesterol têm uma concentração muito baixa.

Percentagens dos vários tipos de esteróis presentes no azeite e o teor de esteróis totais em ppm.

Norma Aplicável: Regulamento Comunitário (CEE) nº 2568/91/Anexo V.

Princípio: A matéria gorda, adicionada de α -colestanol como padrão interno, é saponificada com hidróxido de potássio em solução etanólica. De seguida, o insaponificável é extraído com éter etílico.

A fração esterólica é separada do extrato insaponificável por cromatografia em camada fina de gel de sílica, isolando-se as zonas que correspondem à fração esterólica e à fração de eritrodiol e uvaol.

Os esteróis, o eritrodiol e o uvaol recuperados no gel de sílica são transformados nos respetivos trimetilsililéteres e analisados por cromatografia em fase gasosa em coluna capilar.

Calcula-se a percentagem de cada esteroide a partir da relação entre a área do pico respetivo e a soma das áreas dos tipos de todos os esteróis.

Aplica-se a seguinte equação:

$$\text{esterol}_x = \frac{A_x}{\sum A} \times 100 \quad \text{Eq. 10}$$

Onde,

A_x = área do pico correspondente do esteroide x;

$\sum A$ = soma das áreas dos picos de todos os esteróis.

Para calcular o teor de esteróis totais, em mg/kg, através da soma dos teores de cada um dos esteróis, temos a seguinte equação:

$$\text{Esterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 100}{A_s \cdot m} \quad \text{Eq. 11}$$

Onde,

A_x : Área, no cromatograma, do pico do esteroide x.

A_s : Área, no cromatograma, do pico do α -colestanol.

m_s : Massa de padrão interno (alfa-colestanol) adicionado, em miligramas.

m : Massa da amostra colhida para determinação, em gramas.

Especificações:

Tabela 2.17 - Exemplificação da composição em Esteróis do azeite.

Esterol	Valor (%)
Colesterol	≤ 0.5
Brassicasterol	≤ 0.1
Campesterol	≤ 4.0
Estigmasterol	<Campesterol
B-Sitoesterol	≥ 93.0
Δ -7-Estigmastenol	≤ 0.5
Eritrodiol e uvaol	≤ 4.5

2.6.6. Outros Parâmetros de Análise

▪ Teor em Eritrodiol e Uvaol

Objetivo: Calcular a percentagem da soma do eritrodiol e uvaol, em relação aos esteróis. O eritrodiol (convencionalmente entendido como o conjunto dos dióis eritrodiol e uvaol) é um constituinte da fração insaponificável.

Norma aplicável: Regulamento (CEE) N° 2568/91/Anexo VI e respetivas alterações de acordo com o Regulamento (CE) n° 702/2007.

Princípio: A matéria gorda é saponificada com solução etanólica de hidróxido de potássio, sendo posteriormente extraído o insaponificável com éter etílico e purificado por passagem através de coluna de alumina. Procede-se à separação do insaponificável por cromatografia em camada fina de gel de sílica, isolando-se as manchas correspondentes à fração esterólica e à fração do eritrodiol.

▪ Estigmastadieno

Objetivo: Determinação do teor de estigmastadienos presentes no azeite em mg/kg. O método é aplicado a todos os óleos vegetais, embora as determinações apenas sejam fiáveis nos casos em que o teor de hidrocarbonetos em causa esteja compreendido entre de 0,01 e 4,0 mg/kg. O estigmastadieno é um hidrocarboneto difícil de eliminar no processo de refinação. Valores superiores a 0.05 mg/kg podem indicar a presença de azeite refinado no azeite virgem.

Norma aplicável: Regulamento (CEE) N°2568/91/Anexo XVII e respetivas alterações de acordo com o regulamento (CE) n° 656/95.

Princípio: Isolamento da matéria insaponificável, seguido de separação da fração que contém hidrocarbonetos por cromatografia em coluna de silicagel e análise por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar.

- **Ceras**

Objetivo: Método para a determinação do teor de cera dos azeites. As ceras são separadas em função do número de átomos de carbono. O método pode ser utilizado, em particular, para distinguir o azeite obtido por pressão do azeite obtido por extração (óleo de bagaço de azeitona). A análise permite detetar misturas de azeite com óleo de bagaço, pois estes apresentam um teor de ceras mais elevado.

2.7. Espectroscopia de Infravermelho Próximo

2.7.1. Breve História

A descoberta da região infravermelha (IV) do espectro eletromagnético deve-se principalmente ao astrónomo W. Herschel, em 1800. Tal descoberta ocorreu por acaso e sem que interessasse particularmente. [19]

Sir William Herschel foi um músico bem-sucedido que posteriormente se tornou num astrónomo, tendo sido, sem dúvida, um dos melhores astrónomos observacionais de todos os tempos.

Durante a realização da sua descoberta, Herschel usou um prisma de vidro que fazia com que a luz fosse dividida em diferentes cores equipado com termómetros pintados de negro para a medição da capacidade térmica, permitindo a deteção da existência de radiação térmica na gama de energias imediatamente abaixo da região visível, próximo do vermelho, do espectro solar. Assim, levou á descoberta da existência de um tipo de luz diferente após a zona do vermelho, invisível ao olho humano, ficando conhecida como o “infravermelho”. [20]

Um século depois da descoberta de Herschel, os astrónomos William Abney e Edward Festing, utilizaram a radiação infravermelha, para irradiar moléculas orgânicas obtendo os primeiros espectros de absorção de infravermelho (IV). Deste modo era possível concluir que a espectroscopia de infravermelho media a luz infravermelha que era absorvida pelas substâncias. [19]

Por volta do século XX, encontravam-se publicados espectros de IV de centenas de compostos orgânicos e inorgânicos e algumas bandas de absorção já tinham sido correlacionadas com a presença de determinados grupos presentes nas moléculas. Com o crescimento da pesquisa relacionada à espectroscopia do NIR, por volta de 1993, foi criado o primeiro jornal inteiramente dedicado a essa área, o “Journal of Near Infrared Spectroscopy”. [19]

Todo o avanço ocorrido na instrumentação necessária para aquisição e tratamento de dados espectrais e o surgimento da Quimiometria, que fornece todas as ferramentas para a extração de informação útil do espectro, permitiu o propício crescimento da espectroscopia do NIR. [21]

O crescente aumento da qualidade e da produtividade nas indústrias químicas, petroquímicas, farmacêuticas, alimentares, entre outras, fez com que as técnicas, tais como, GC e HPLC, fossem complementadas com ferramentas analíticas mais específicas e compatíveis com o meio ambiente. A espectroscopia NIR surgiu na última década e tem sido uma ferramenta importante no monitoramento de processos e controlo de qualidade. [21]

2.7.2. Princípios Teóricos

A região do infravermelho situa-se entre as gamas do visível e as micro-ondas no espectro eletromagnético.

A radiação infravermelha divide-se em 3 zonas: Infravermelho próximo (NIR), Infravermelho médio (MIR) e Infravermelho longínquo (FIR), tal como se encontra ilustrado na Figura 2.2.

A região NIR do espectro eletromagnético estende-se desde o final da região espectral visível (700 nm ou 14285 cm^{-1}) até o início da região espectral infravermelho fundamental (IR) (2500 nm ou 4000 cm^{-1}). Assim, a maioria das espécies químicas e bioquímicas exibem bandas de absorção únicas na região espectral NIR que podem ser usadas tanto para fins qualitativos como quantitativos. [22]

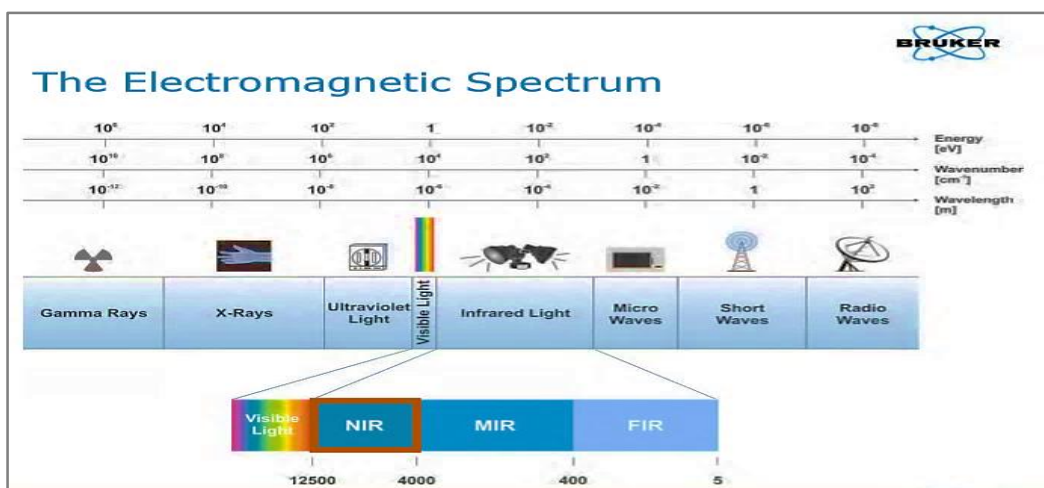


Figura 2.2 - Ilustração do espectro eletromagnético. Adaptado de [22].

O termo espectroscopia designa métodos analíticos, em que se estuda a interação de radiações electromagnéticas com as moléculas. A ligação de dois átomos nas moléculas envolve diferentes tipos de energia, tais como energia eletrónica, vibracional e translacional. No caso da espectroscopia de infravermelho, esta tem por base os movimentos relativos dos átomos numa molécula, isto é, as suas vibrações. Esta espectroscopia deteta a radiação que é absorvida pelas ligações vibracionais moleculares. [23]

Para um composto apresentar um espectro de absorção na região do infravermelho, é necessário que a frequência da radiação seja igual à frequência de vibração da molécula, ou seja, terá de ser igual à diferença entre os estados excitado e fundamental, ou a frequência de vibração terá de provocar alteração do momento dipolar. Considerando as moléculas como o H_2 , O_2 , as vibrações causadas pela radiação infravermelha não alteram o momento dipolar destas moléculas, não sendo assim ativas no infravermelho. [24]

A espectroscopia de infravermelho próximo gera espectros que apresentam sobreposições e bandas de combinações, diferindo da espectroscopia MIR, uma vez que ocorrem apenas transições de vibração fundamental surgindo assim espectros com picos definidos e interpretados diretamente. [23]

As bandas de absorção mais proeminentes que ocorrem na região NIR estão relacionadas às bandas das vibrações moleculares fundamentais dos grupos funcionais C-H, N-H, O-H e S-H, permitindo a determinação de humidade, gorduras, proteínas e hidratos de carbono, Tabela 2.18. [22]

Tabela 2.18 - Comprimentos de onda em nm e números de onda em cm^{-1} de algumas bandas NIR

Comprimento de onda (nm)	Número de onda (cm^{-1})	Grupo Funcional	Descrição
2500	4000	S-H	Combinação do estiramento S-H
2200-2460	4545-4065	C-H	Combinação do estiramento C-H
2000-2200	5000-4545	N-H, O-H	Combinação do estiramento N-H + Combinação do estiramento O-H
1620-1800	6173-5556	C-H	1ª Sobreposição do estiramento C-H
1400-1600	7143-6250	N-H, O-H	1ª Sobreposição do estiramento N-H + 1ª Sobreposição do estiramento O-H
1300-1420	7692-7042	C-H	Combinação do estiramento C-H
1100-1225	9091-8163	C-H	2ª Sobreposição do estiramento C-H
950-1100	10526-9091	N-H, O-H	2ª Sobreposição do estiramento N-H + 2ª Sobreposição do estiramento O-H
850-950	11765-10526	C-H	3ª Sobreposição do estiramento C-H
775-850	12903-11765	N-H	3ª Sobreposição do estiramento N-H

As bandas de absorção NIR são tipicamente 10-100 vezes mais fracas do que a correspondente banda de absorção MIR correspondente. Esta fraca natureza das absorções de NIR é realmente uma vantagem analítica, uma vez que permite a análise direta de matrizes fortemente absorventes, de dispersão de luz, como suspensões, pastas e pós. As bandas de absorção NIR também são muito amplas (largura de banda de 50-100 nm) e altamente sobrepostas. [22]

Como a intensidade de uma banda de absorção é proporcional à concentração do componente que causa esta banda, a quantidade de um composto existente numa amostra pode ser determinada através de uma curva de calibração (intensidade da banda versus concentração) construída a partir de amostras com concentrações conhecidas do composto em questão, através de uma análise multivariada devido ao elevado número de variáveis obtidas num espectro NIR (*Lei de Lambert-Beer*). [23]

Para que uma determinada molécula apresente absorção no IV, as suas vibrações moleculares devem resultar numa alteração do momento dipolar.

As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais ou estiramentos e deformações angulares. Os estiramentos são as alterações da distância internuclear dos átomos envolvidos, Já as deformações angulares podem consistir de uma mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos. [24]

Vibrações Moleculares

As vibrações moleculares resultantes podem ser classificadas em duas categorias, tal como foi dito anteriormente.

As de alongamento são alterações da distância internuclear dos átomos envolvidos, ou seja, aumento e diminuição dessa distância, alternadamente. Já as deformações angulares podem consistir numa mudança no ângulo de ligação com um grupo de átomos ou o movimento de um grupo de átomos em relação à restante molécula. [24] [25]

O número de modos normais de vibração de uma molécula é determinado de acordo com seus graus de liberdade de vibração, por exemplo, para uma molécula não linear (de n átomos) tem $3n-6$ graus de liberdade vibracionais, já moléculas lineares apresentam $3n-5$ graus de liberdade vibracionais. [25]

Tendo como exemplo a molécula triatômica, como é o caso da água, H_2O , esta molécula apresenta três vibrações fundamentais ($3 \times 3 - 6 = 3$): estiramento simétrico e assimétrico e deformação do tipo tesoura, com absorções em 3652, 3756 e 1596 cm^{-1} respetivamente. [25]

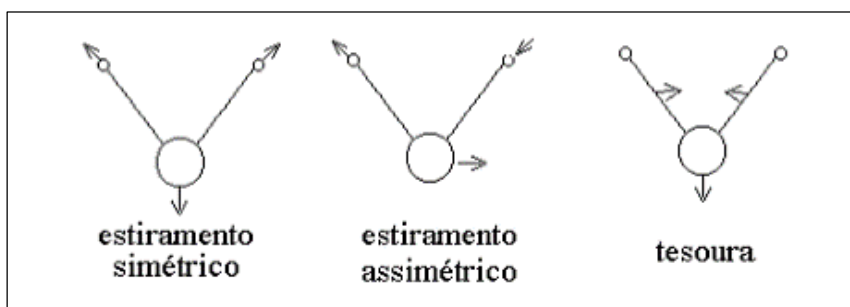


Figura 2.3 - Representação esquemática dos modos vibracionais fundamentais da molécula de água. Adaptado de [25].

2.7.3. Equipamento NIR com Transformada de Fourier (FT-NIR)

Os primeiros espectrofotômetros de infravermelho (IV) utilizados para análise química eram todos dispersivos, nos quais se efetuava a varredura do espectro com luz monocromática.

Tais equipamentos eram, na sua grande maioria, do tipo analógico, de baixa sensibilidade e com um longo tempo de varredura dos espectros (normalmente cerca de 15 minutos por amostra).

Com o avanço dos microcomputadores, os espectrofotômetros com Transformada de Fourier passaram a ser preferencialmente utilizados, pois apresentam vantagens sobre os dispersivos. Nomeadamente melhoria da razão sinal/ruído resultante do aumento da intensidade ótica através da amostra. [25]

A espectroscopia de infravermelho próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) foi desenvolvida para superar as limitações encontradas com a instrumentação dispersiva NIR. [26]

Seguidamente, será feito um breve resumo do princípio de funcionamento de um espectrofotómetro com Transformada de Fourier.

Os espectrofotómetros FT-NIR têm por base o interferómetro de Michelson. Neste sistema a radiação da fonte luminosa é dividida em dois feixes iguais através de um beamsplitter (divisor de feixe). Um dos feixes irá seguir em direção a um espelho de posição fixa no qual reflete de volta para o beamsplitter, voltando a dividir-se e parte desta é dirigida para o detetor.

Outro feixe parte do beamsplitter em direção ao espelho móvel, visto que este espelho também reflete, ocorrendo nova divisão beamsplitter e parte da radiação segue também para o detetor. Deste modo, consegue-se percorrer todos os comprimentos de onda em estudo.

O espelho percorre uma determinada distância sendo formado um interferograma com a recombinação dos dois feixes. [23] [25]

Porém, apesar de o interferograma conter toda a informação fornecida pelo espectrofotómetro, a forma como a apresenta não é considerada muito útil. Com a Transformada de Fourier obtém-se o espectro de IV, em absorvância/transmitância por número de ondas, similar aos obtidos em aparelhos dispersivos. [25]

A Figura 2.4 faz a representação esquemática do interferómetro de Michelson, do interferograma gerado e a obtenção do espectro.

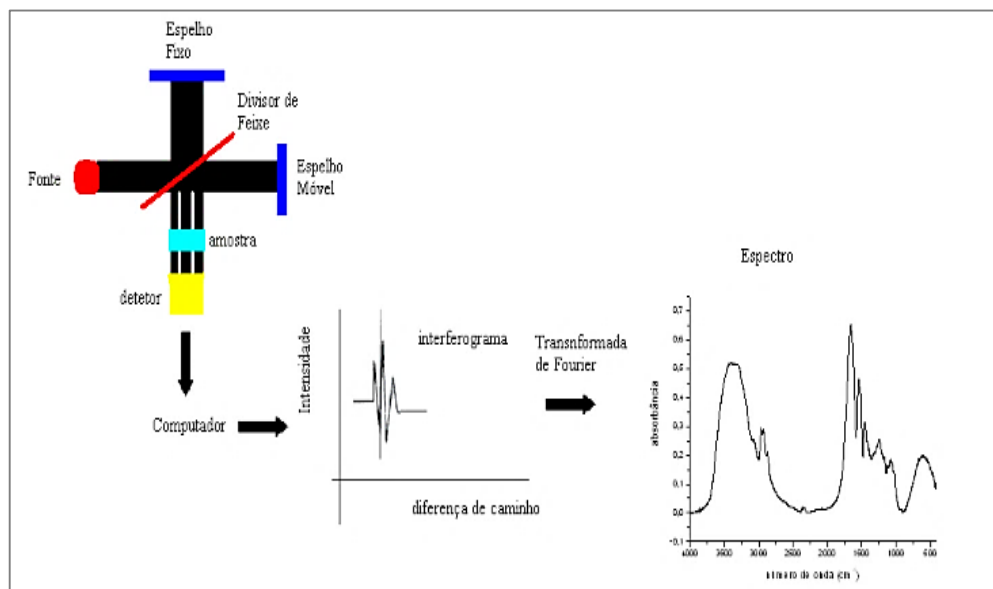


Figura 2.4- Representação esquemática do princípio de funcionamento de um FT-NIR. Adaptado de [25].

De acordo com a Figura 2.4, a luz infravermelha emitida pela fonte é direcionada para um *interferómetro*, onde é modelada.

Após o interferómetro, a luz passa pelo compartimento da amostra e é concentrada para o detector. O sinal medido pelo detector designa-se por *interferograma*.

Com recurso à Transformada de Fourier obtém-se um gráfico que relaciona absorvância/transmitância por número de ondas (cm^{-1}), isto é, é obtido um espectro de IV. [25]

2.7.4. Vantagens e Desvantagens da aplicação de NIRS

A espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) foi evoluindo ao longo dos últimos anos e possui inúmeras aplicações nas indústrias farmacêutica, polímeros e na indústria química.

Embora seja usada para análises quantitativas, em muitas circunstâncias, o uso mais frequente tem sido a confirmação inequívoca da identidade da matéria-prima. [6] [26]

Este tipo de espectroscopia, embora complexa, tem as seguintes vantagens:

- Medição rápida sem qualquer tipo de preparação da amostra;
- Não são necessários reagentes adicionais e não produz resíduos;
- Determinação simultânea de diversos componentes;
- Eliminação da exposição dos trabalhadores a produtos químicos nocivos no teste de matéria-prima;
- Rápida leitura das amostras (< 30s);
- Utilização da técnica ao longo de todo o processo produtivo, desde a recepção de matérias – primas até ao produto final;
- Manutenção reduzida;
- Permite a conformidade de acordo os requisitos regulamentares.

Porém a espectroscopia de infravermelho próximo tem as seguintes desvantagens: [24]

- A construção de modelos de calibração robustos e precisos é considerado por vezes difícil, implicando a utilização de um número razoavelmente elevado de amostras de modo a que seja possível abranger todas as variações das propriedades químicas;
- Necessidade de incorporar as variabilidades químicas e físicas das amostras, implicando a utilização de modelos de calibração complexos, consoante o tipo de amostra e mais do que um modelo por cada propriedade em análise;
- Na espectroscopia NIRS, a construção de modelos requer sempre o conhecimento prévio da propriedade em análise, que deve ser determinada por um método de referência.

2.8. Quimiometria

A Quimiometria é uma área de estudo que aplica métodos matemáticos e estatísticos às ciências químicas. Permite desenvolver modelos que estimem propriedades, por análise de outras propriedades. [1] Não é uma disciplina da matemática, mas sim da química, isto é, permite a resolução de problemas de interesse e originados na química, utilizando ferramentas que provêm principalmente da matemática, estatística e computação. [27]

Foi por volta de 1972, que o termo “quimiometria” foi introduzido no mundo da ciência, pelo sueco *Svante Wold* e pelo americano *Bruce R. Kowalski*. Em 1974, fundou-se a Sociedade Internacional de Quimiometria que conduziu à primeira descrição da disciplina. Posteriormente certos jornais científicos incluíram uma seção para artigos desta área. [28]

Atualmente existem jornais científicos apenas dedicados à quimiometria, tais como, o *Chemometrics and Intelligent Laboratory System* (Elsevier) e o *Journal of Chemometrics* (Wiley). [29]

Hoje em dia, a definição da quimiometria corresponde:

“Disciplina da química que utiliza matemática e estatística para projetar ou selecionar procedimentos experimentais ótimos, fornecer informações químicas relevantes analisando dados químicos e obter conhecimento sobre sistemas químicos.” [29]

Uma das características mais interessantes dos instrumentos analíticos modernos é o número de variáveis que podem ser medidas através da análise de uma única amostra, levando assim, em particular, ao desenvolvimento de aplicações de métodos quimiométricos destinados à análise de dados químicos de natureza multivariada. [28]

Para além dos métodos estatísticos-matemáticos, os tópicos da quimiometria também estão relacionados com problemas do laboratório de computação, métodos de manipulação de bases de dados químicas ou espectroscópicos. Em regra, estes desenvolvimentos são dedicados a requisitos práticos específicos, tais como a otimização automática de separações cromatográficas ou na predição da atividade biológica de um composto químico. [29]

No caso da espectroscopia NIR, as bandas presentes nos espectros surgem de sobreposições e combinações. Devido à grande quantidade de sinais gerados, é necessário recorrer a técnicas de quimiometria por análise multivariada para a determinação de concentrações dos componentes pretendidos. [27]

Relativamente às suas aplicações, a quimiometria pode ser aplicada em diversas áreas, sendo uma das principais a espectroscopia FT-NIR, implicando a utilização de algoritmos e técnicas quimiométricas no pré-tratamento dos espectros NIR traçados, desenvolvimento de métodos qualitativos e quantitativos, seleção de amostras para o conjunto de calibração e conjunto de validação e ainda a identificação de amostras anómalas (outliers). [27]

2.9. Análise Multivariável

O controlo de qualidade baseia-se na recolha sequencial de dados para efetuar a sua análise. A maioria dos dados é de natureza multivariada. Os métodos modernos de análise automática proporcionam oportunidades de adquirir elevada quantidade de dados com facilidade. Os métodos cromatográficos e espectroscópicos fornecem dados analíticos dos vários componentes pertencentes a um determinado composto. Situações como estas, onde várias variáveis são medidas para cada composto, produzem dados multivariados. [30]

No âmbito do trabalho desenvolvido, mais precisamente, na análise de óleos vegetais e azeites, ocorre a determinação diária de diversos parâmetros para cada amostra analisada para o controlo de qualidade. A aplicação da espectroscopia permite a análise dos diversos componentes constituintes.

O objetivo das técnicas de calibração é a correlação de quantidades medidas como é o caso da absorção de radiação infravermelha, com as propriedades do sistema, como por exemplo, a concentração de um componente num sistema de multicomponentes. [31]

No estudo de análises multivariadas para a qualificação e quantificação em aplicações NIR existem vários algoritmos, os quais se destacam a análise de componentes principais, análise de Clusters, a regressão por mínimos quadrados parciais, a regressão por componentes principais, a regressão múltipla linear, entre outros. [23]. O software do equipamento utilizado neste trabalho, designado por OPUS/QUANT, utiliza o método de regressão linear por mínimos quadrados parciais (PLS).

A calibração multivariável não considera apenas um único ponto espectral, mas sim uma gama espectral ampla. Deste modo torna-se viável a análise da sobreposição de bandas espectrais.

É aplicado o método de regressão denominado por PLS (*Partial Least Square*) que permite a comparação das informações contidas nos espectros das amostras de calibração com a informação dos valores de concentração das amostras. Contudo, a correlação entre a concentração de componentes e as alterações nos espectros não terá de ser linear. Este tipo de calibração exige um grande número de amostras de calibração gerando uma enorme quantidade de dados. [31]

2.9.1. Algoritmo PLS

Para a análise de sistemas multicomponentes caso se pretenda prever apenas um componente é usado o Algoritmo PLS1. Para a previsão de todos os componentes em simultâneo é usado o Algoritmo PLS2. O software OPUS/QUANT utilizado usa principalmente o algoritmo PLS1. [31]

De um modo geral, o princípio de um método de análise quantitativa é a determinação da propriedade Y de um sistema a partir de uma observação experimental X, onde Y e X irão estar correlacionados por uma função de calibração b.

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ \dots \\ Y_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \text{Spectrum 1} \\ \text{Spectrum 2} \\ \dots \\ \text{Spectrum 3} \end{bmatrix} \cdot \vec{b}$$

Figura 2.5- Exemplificação do princípio do método de regressão PLS.
Adaptado de [31].

As linhas da matriz X são formadas com base nos espectros de calibração. O vetor Y é constituído pelos valores dos componentes determinados pelos métodos de referência. Tem como objetivo determinar o vetor b, ou seja, quando o vetor for conhecido, é possível prever os valores desconhecidos de Y_n .

Na aplicação da regressão PLS, as matrizes X são reduzidas a apenas certos fatores. A principal dificuldade é a inversão da matriz $X^T X$. Este método envolve assim o cálculo de uma inversa restrita, em vez de toda a matriz. O método vai requerer que a matriz X seja bi-diagonalizada:

$$X = UBV^T$$

Podendo esta expressão também ser escrita da seguinte forma:

$$X = TV^T$$

As matrizes U e V são ortonormais e B é da forma bi-diagonal. Os elementos pertencentes à matriz T são designados como os “scores” e os vetores PLS são denominados de “loadings”.

Posteriormente, é escolhido um vetor inicial v_1 para a análise PLS,

O primeiro vetor mostra as correlações entre os valores do componente e as intensidades dos espectros de calibração. A análise PLS poderá ficar terminada se os valores do componente Y forem reproduzidos de forma consistente com o auxílio do vetor b.

Em relação ao número de vetores PLS utilizados, é definido no software *QUANT* através do tamanho do Rank. O cálculo do Rank ótimo é feito apenas se o número de espectros de calibração for suficientemente elevado. Uma vantagem importante da regressão PLS é o fato dos fatores serem dispostos na sequência correta, conforme o seu peso na previsão dos valores dos componentes. [31]

O erro RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation) é calculado a partir da soma dos quadrados dos erros (SSE), sendo M o número de amostras e R o Rank.

$$RMSEE = \sqrt{\frac{1}{M-R-1}SSE} \quad \text{Eq. 12}$$

O residual (Res) é a diferença entre o valor verdadeiro e o previsto. A soma dos quadrados dos erros (SSE) é então a soma quadrática desses valores.

$$SSE = \sum [Res_i]^2 \quad \text{Eq. 13}$$

O coeficiente de determinação, R^2 , demonstra a percentagem de variância presente nos valores verdadeiros que é reproduzida na regressão.

$$R^2 = \left(1 - \frac{SSE}{\sum (y_i - y_m)^2}\right) \times 100 \quad \text{Eq. 14}$$

Pode atingir 100% quando os valores de concentração previstos igualam os valores verdadeiros. O valor deste parâmetro pode ser negativo. Em alguns casos, para Ranks baixos, quando os resíduos são superiores relativamente à variância nos valores verdadeiros (y_i).

A distância de Mahalanobis é aplicada para a deteção de outliers, sendo calculada pelo software *OPUS*.

O limite da distância é determinado com base na distribuição de todos os espectros de calibração, calculando o valor médio e o desvio-padrão. Assumindo que existe uma distribuição normal, define-se um limite unilateral que abrange uma probabilidade de 99.99%.

Após o pré-tratamento espectral, o espectro de calibração medido, é representado por x_i e o espectro reconstruído a partir dos vetores PLS, v_r . Os coeficientes dos scores designam-se por s_i e $t_{i,r}$.

$$s_i = \sum t_{i,r} v_r \quad \text{Eq. 15}$$

Quanto melhor for a reprodução do espectro, menor irá ser o resíduo espectral.

O resíduo espectral é calculado através da soma das diferenças do total de pontos de frequência selecionados do espectro.

$$SpecRes = \sqrt{\sum (x_i - s_i)^2} \quad \text{Eq. 16}$$

Para o reconhecimento de outliers, calcula-se o valor F .

$$FValue_i = \frac{(M-1)(SpecRes_i)^2}{\sum_{j \neq i} (SpecRes_j)^2} \quad \text{Eq. 17}$$

Espetros que sejam fracamente representados pelos vetores PLS apresentam um valor F alto. A descrição do Algoritmo PLs teve como referência o Manual OPUS/QUANT do equipamento. [31]

2.9.2. Validação dos Modelos

O software *QUANT* tem como objetivo a análise quantitativa de uma amostra de multicomponentes desconhecida. Contudo, antes de ser possível realizar essa análise, é necessário o modelo “conhecer” o sistema onde vai ser usado. Significa então, que é preciso desenvolver um modelo quimiométrico, utilizando amostras de calibração de composição conhecida e que representem o sistema. Os espectros NIR são recolhidos e utilizados pelo software para realizar o cálculo da função de calibração, que será essencialmente, o modelo a ser utilizado no futuro na análise de amostras desconhecidas. [31]

Após o desenvolvimento do modelo, é importante proceder à sua avaliação para testar a sua fiabilidade de previsão, ou seja, realiza-se a sua Validação.

Existem dois tipos de validação: “Validação Cruzada” e “Validação Externa”. [31]

Para a determinação do modelo e do número ideal de fatores pode-se utilizar a validação cruzada e para a obtenção de um modelo robusto utiliza-se a validação externa. [23]

A seguir, apresentam-se as principais fórmulas a aplicar para a validação cruzada e para a validação externa.

- **Validação Externa**

Neste tipo de validação calcula-se um erro médio de previsão, denominado por RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction),

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{M} \sum (Differ_i)^2} \quad \text{Eq. 18}$$

Neste tipo de validação são usados dois grupos independentes de amostras, um para a calibração do sistema e o outro grupo para sua validação do modelo. Ambos os grupos devem ter aproximadamente o mesmo número de amostras. [30]

A vantagem da validação assenta no fato da velocidade de cálculo quando se lida com um elevado número de amostras. Por vezes, esta validação é obrigatória por regulamentações governamentais.

- **Validação Cruzada**

Na validação cruzada o erro calculado designa-se por RMSECV (Root Mean Square of Prediction), que avalia a qualidade do modelo.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{M} \cdot \sum_{i=1}^M (Differ_i)^2} = \sqrt{\frac{1}{M} \cdot PRESS} \quad \text{Eq. 19}$$

Neste tipo de validação apenas é usado um grupo de amostras para calibrar e validar o sistema. Antes de se proceder à calibração, uma amostra é excluída do grupo. Esta amostra será então usada para a validação. As restantes amostras são utilizadas para a calibração do sistema.

A principal vantagem da validação cruzada é o fato de necessitar de poucas amostras.

Caso o número de amostras disponíveis for limitado, deve-se usar este método em vez da validação externa. [31]

Outro fator importante, é o Desvio Residual de Previsão (Residual Prediction Deviation), RPD, estando diretamente relacionado com a qualidade do modelo de calibração desenvolvido.

Existem diversos limites que definem vários tipos de modelos, ou seja, se o modelo se adequa ao rastreio de uma amostra, se à quantificação de componentes no controlo de qualidade, ou ainda se o modelo tem a capacidade de responder a todas as questões analíticas. [23]

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentam-se os materiais e os métodos usados no estudo realizado aos óleos vegetais e ao azeite para a aplicação da Espectroscopia de Infravermelho Próximo por Transformada de Fourier (FT-NIR).

As amostras dos óleos vegetais refinados, foram analisadas previamente pelos métodos de referência apresentados no Capítulo 2, na Sovena Portugal – Consumer Goods. Os óleos vegetais crus foram analisados previamente na Sovena Oilseeds Portugal, localizada em Almada.

Na primeira parte do trabalho desenvolvido, foram colecionadas amostras de todos os produtos consoante as entradas e os lotes produzidos. Recolheu-se todos os valores dos parâmetros analisados pelos métodos de referência. Deste modo procedeu-se a testes estatísticos, através do *Software Bruker OPUS Quant 2 v7.0*.

O tratamento dos dados pelas técnicas de quimiometria, os resultados dos testes aos modelos presentes no sistema encontram-se apresentados no Capítulo 4.

Como segunda parte do trabalho, foram efetuadas análises e comparações entre o método FT-NIR e os métodos de análise de referência dos óleos e azeite, para posterior validação do método e definição de critérios de aceitação com recurso a testes comparativos (Teste t das diferenças). Posteriormente recorreu-se a parâmetros de avaliação da precisão dos métodos, como é o caso da Repetibilidade. Calculou-se o limite de repetibilidade (r), o desvio padrão e o coeficiente de variação da repetibilidade (CV_r), permitindo avaliar a precisão do método em estudo.

Por último, iniciou-se o estudo de misturas de óleos e azeites virgens extra, tendo sido definido um ensaio piloto para iniciar o estudo das misturas destes produtos.

O ensaio foi dividido em três partes:

- **Parte A:** elaboração da mistura inicial com lotes de soja e girassol para testar a sensibilidade do equipamento;
- **Parte B:** misturas com novos lotes dos óleos de soja e girassol.
- **Parte C:** elaboração de misturas com os óleos de soja, girassol e azeite virgem extra.

3.1. Equipamento FT-NIR

O MPA (Multi Purpose Analyser) é um espectrómetro FT-NIR muito flexível, concebido para aplicações de rotina e desenvolvimento de métodos. Permite a análise de líquidos, sólidos e pós em transmitância, bem como em refletância difusa.

A análise das amostras de óleos vegetais e azeite foram realizadas no espectrofotómetro da Bruker Optic GmbH Germany, modelo MPA, o qual tem um detetor INGaAs (índio-gálio-arsénio).

Este modelo possui apenas um compartimento para amostras com vial de 8 milímetros, sem ser necessário preparação prévia e proporciona aquecimento da amostra.

O equipamento possui um programa para testar o seu desempenho designado por OVP (OPUS Validation Program), que executa uma série de testes para avaliação do desempenho do instrumento e determina se o espectrofotômetro opera de acordo com as especificações.



Figura 3.1- Equipamento MPA da Bruker. Adaptado de [32].

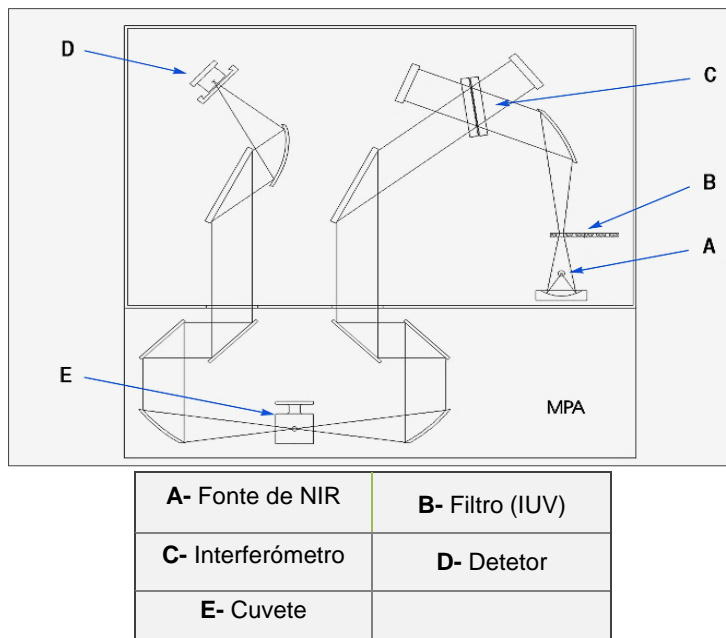


Figura 3.2 – Percurso ótico do modelo MPA da Bruker utilizado. Adaptado de [32].

3.2. Procedimento de Aquisição de espectros e Elaboração de Modelos

SOFTWARE OPUS QUANT 2 V7.0 DA BRUKER (ESPECTROFOTÓMETRO DA BRUKER OPTIC GMBH, MODELO MPA (*Multi-purpose Analyser*))

1. Leitura de amostras e Elaboração de modelos

- a) Em primeiro lugar, recolher todos os espectros das amostras. A aquisição dos espectros é realizada com base numa técnica simples, utilizando uma pipeta Pasteur e transferindo uma pequena quantidade do óleo ou azeite (cerca de 80% da cuvete).
- b) De seguida, realizar uma análise ao número de amostras disponíveis, a sua distribuição pelos diferentes tipos de óleos, dos azeites e a respetiva gama de valores dos parâmetros em estudo. Recolher e inserir todos os valores de referência no software do equipamento.

Nota: os valores dos parâmetros em estudo são fornecidos pelo Laboratório SOVENA.



Figura 3.3 - Equipamento utilizado no trabalho desenvolvido.



Figura 3.4 - Compartimento para leitura de amostras.

- c) Após o ponto b) proceder à verificação do estado dos modelos desenvolvidos e que se encontram a ser utilizados no equipamento realizando testes de modo a obter os parâmetros dos modelos (Rank, RPD, R^2 , RMEP).

Este método permite retirar toda a informação necessária dos modelos presentes no sistema do equipamento FT-NIR.

- d) Após os testes estatísticos decidir quais os modelos que podem ser otimizados em termos de precisão ou gama de calibração. Caso seja possível realizar uma divisão das amostras em grupos específicos de óleos vegetais e azeites consoante o trabalho a ser desenvolvido.
- e) O desenvolvimento de modelos é efetuado com recurso ao software OPUS v7.0 da Bruker. Para tal, o software do equipamento utiliza o *Método de Regressão dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS)*, sendo este um método quantitativo.

2. Parâmetros do equipamento

Durante a aquisição de espectros, há que ter em consideração os parâmetros que se encontram na Tabela 3.1. Normalmente para adquirir espectros de amostras de valores conhecidos, é necessário recolher no mínimo 2 espectros por amostra. Em primeiro lugar, adquirir um espectro branco sem a amostra no compartimento da amostra.

Tabela 3.1- Parâmetros a usa no software do equipamento na recolha dos espectros.

Parâmetro	Valor
Espectro resultante (cm ⁻¹)	Absorvância
Resolução (cm ⁻¹)	8
Região Espectral	12 500 – 4 500
Acumulações ("scans")	32
Estado da amostra	Líquido
Temperatura da amostra (°C)	55*

(**Equipamento** – Espectrofotómetro da Bruker Optic GmbH Germany; Modelo MPA (*Multi-purpose Analyser*); c/ compartimento para amostras e aquecimento das amostras).

*O equipamento proporciona o aquecimento da amostra durante a análise.

4. Resultados e Discussão

4.1. Modelos Existentes

Como primeira parte deste trabalho, analisaram-se os modelos existentes no sistema e a sua robustez, de forma a decidir quais deveriam ser otimizados e quais deveriam ser criados de raiz. Porém, tendo em consideração o âmbito do trabalho a ser desenvolvido não houve a criação de novos modelos e apenas se procedeu à verificação do estado dos modelos existentes para os óleos vegetais e azeite virgem extra.

Quando se procede à otimização de modelos, estes podem ser otimizados em termos da sua precisão ou gama de calibração. Ou seja, podemos alargar a gama de valores dos parâmetros em estudo, de modo a ser a mais extensa possível cobrindo toda a gama de acordo com as especificações para cada parâmetro, ou aumentar a precisão do modelo diminuindo o erro associado.

Neste subcapítulo serão discutidos os resultados dos testes estatísticos realizados aos seguintes óleos vegetais: óleo de soja cru, óleo de girassol cru e óleo de girassol refinado.

Estes óleos vegetais apresentaram problemas em relação à sua capacidade de previsão durante as análises efetuadas.

De forma a ser possível aceder aos modelos destes óleos no sistema FT-NIR, realizaram-se testes com amostras disponibilizadas neste estudo sendo possível retirar os resultados estatísticos dos modelos.

Todo este processo é semelhante a uma validação externa, utilizando um grupo de amostras suficientemente abrangível na gama dos parâmetros e calculou-se os três parâmetros mais importantes para a caracterização dos modelos (RPD, R^2 e RMSEP).

Óleo de soja cru

As amostras usadas para os testes dos modelos do óleo de soja cru pertencem ao grupo de amostras usadas na validação do método abordado no subcapítulo 4.2.

Devida à pouca disponibilidade de amostras deste tipo de óleo, quando se efetuou a análise das amostras deste óleo foram recolhidos os espetros e os valores dos parâmetros analisados pelos métodos de referência e guardados no sistema. O número de amostras é relativamente reduzido, no entanto conseguiu-se obter os resultados estatísticos da acidez e de determinados ácidos gordos.

A Figura 4.1 exemplifica o resultado obtido relativo ao teste para a acidez do óleo de soja cru.

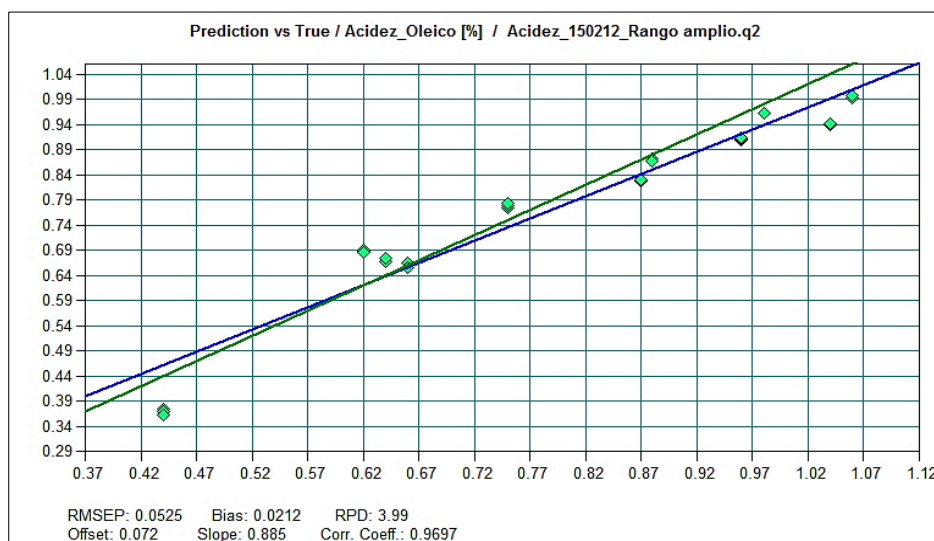


Figura 4.1 – Ilustração do teste feito para o modelo da acidez às amostras de óleo de soja cru.

Observando a figura anterior, no eixo das ordenadas do gráfico apresenta-se o valor do parâmetro que o modelo foi capaz de prever. No eixo das abcissas encontram-se os valores verdadeiros do parâmetro das amostras usadas, obtidos pelos métodos de referência.

A reta a verde presente no gráfico é uma reta de declive igual a 1, do tipo $y=x$. Caso o modelo para a acidez fosse considerado perfeito, o valor previsto pelo modelo iria igualar o valor verdadeiro e todos os pontos iriam apresentar-se sobre a reta.

No caso da presença de valores atípicos, também designados por outliers, iriam-se apresentar a vermelho. O software tem a capacidade de identificar outliers através da distância limite de Mahalanobis, indicando que tais pontos apresentariam um desvio face à previsão maior do que 99.9%.

Os testes realizados no software fornecem os principais parâmetros estatísticos que avaliam a robustez de um modelo. O RMSEP (validação externa) corresponde ao erro de previsão associado ao modelo, o RPD refere-se ao desvio residual da previsão do modelo e está diretamente relacionado com a qualidade do modelo de calibração desenvolvido, o R^2 designa o coeficiente de correlação, tendo o valor máximo de 100% e permite verificar a correlação entre os valores previstos e os valores verdadeiros.

Outro resultado possível obter neste procedimento encontra-se ilustrado na Figura 4.2. Fazendo uma breve análise, o gráfico demonstra a diferença entre os valores previstos e os valores verdadeiros das amostras analisadas.

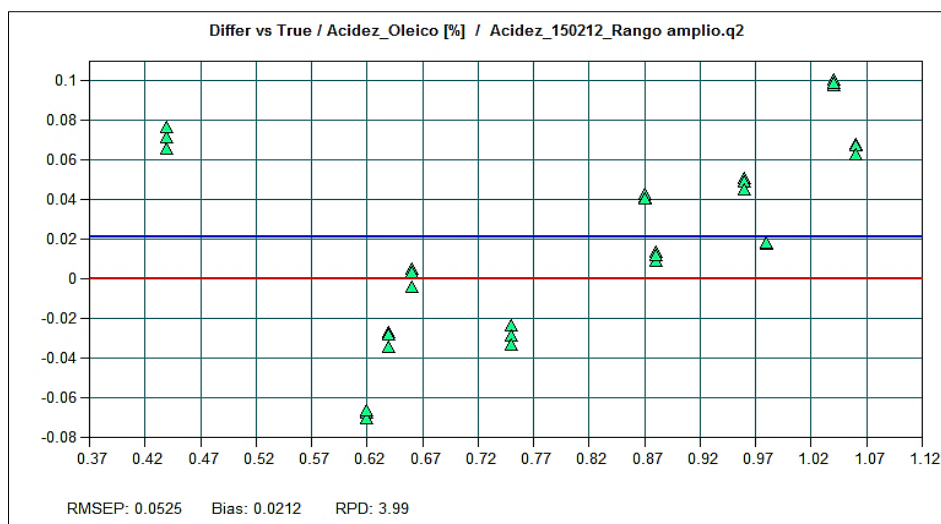


Figura 4.2 - Ilustração das diferenças de valores previstos e verdadeiros para a acidez às amostras de óleo de soja cru.

Tabela 4.1 - Resultados estatísticos do modelo da acidez do óleo de soja cru.

Parâmetro	R ²	RMSEP	RPD
Acidez (%)	96.97	0.0525	3.99

Tabela 4.2 - Resultados estatísticos dos modelos dos ácidos gordos do óleo de soja cru.

Parâmetro	R ²	RMSEP	RPD
C18:0	78.64	0.394	1.22
C18:2	23.15	1.72	1.02
C20:0	29.66	0.0296	1.02
C22:0	72.29	0.0315	1.26
C24:0	34.26	0.0433	1.06

Conclui-se que, mesmo com pouca disponibilidade de amostras, os modelos testados apresentam resultados satisfatórios.

Relativamente à acidez, o modelo apresenta um coeficiente de correlação de aproximadamente 97 e um RPD > 3, sendo muito satisfatório.

Em relação aos modelos dos ácidos gordos, caso haja maior disponibilidade de amostras analisadas pelos métodos de referência, adicioná-las aos modelos com o objetivo de aumentar as suas gamas de calibração e precisão.

Óleo de girassol cru

As amostras usadas para os testes dos modelos de girassol cru também pertencem ao grupo de amostras usadas no subcapítulo 4.2, relativo à validação do método.

O número de amostras é relativamente reduzido, no entanto foi possível obter os resultados estatísticos de determinados ácidos gordos, encontrando-se apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Resultados estatísticos do modelos dos ácidos gordos do óleo de girassol cru.

Parâmetro	R ²	RMSEP	RPD
C18:0	51.82	0.951	1.06
C18:2	98.65	0.32	4.84
C18:3	-0.00909	0.0191	0.921
C22:0	60.59	0.0186	1.59
C24:0	50.34	0.127	1.42

Fazendo uma análise aos ácidos gordos presentes na Tabela 4.3, o modelo do ácido gordo C18:2 apresenta uma boa capacidade preditiva (R² e RPD).

No caso do modelo do ácido gordo C18:3, este apresenta uma fraca capacidade preditiva. O modelo a ser usado pelo software apresenta uma correlação muito fraca entre os valores previstos e os valores verdadeiros (R² -9.09E-03 e RPD <1).

O grupo de amostras usado para o teste ao modelo também apresentou uma fraca variação do parâmetro.

Será importante adicionar mais amostras analisadas pelos métodos de referência e com maior variabilidade de valores do parâmetro, ao modelo com a finalidade de melhorar a sua gama de calibração e a sua precisão.

Contudo, há que ter em consideração a origem da semente do óleo de girassol. De acordo com o relatório da Comissão do Codex Alimentarius – *Codex Committee on Fats and Oils*, relativo a março de 2017, foram apresentadas propostas de alteração dos limites dos ácidos gordos do

óleo de girassol relativamente à versão atualmente em vigor (CODEX STAN 210 – 1999, Revisão 2009, Emenda 2015). [33]

O referido relatório reconhece que pode haver variações nos fatores essenciais de composição e qualidade dos óleos vegetais, devido a fatores geográficos ou climáticos nacionais. Existem evidências científicas e dados apresentados pela Argentina, Brasil e Uruguai, que permitem provar que a temperatura influencia as gamas de ácidos gordos do óleo de girassol, especialmente os ácidos oleico e linoleico, produzidos a partir de sementes de girassol cultivadas em novas áreas de produção mais quentes do que as tradicionais.

Óleo de girassol refinado

Relativamente ao óleo de girassol refinado, os modelos referentes aos seus parâmetros foram elaborados na sequência de um estágio anterior. As amostras usadas nos testes não correspondem às amostras utilizadas no subcapítulo relativo à validação do método.

Os modelos testados encontravam-se protegidos no sistema FT-NIR e obteve-se os resultados estatísticos dos modelos a que foi possível aceder aos seus dados permitindo analisar a sua robustez.

Tabela 4.4 - Resultados estatísticos dos modelos dos ácidos gordos do óleo de girassol refinado.

Parâmetro	R ²	RMSEP	RPD
C16:0	17.88	0.275	0.987
C18:0	39.29	0.092	0.533
C18:2	89.99	0.263	2.28
C18:3	17.81	0.034	1.02

Tabela 4.5 - Resultados estatísticos dos parâmetros K270 e K230 do óleo de girassol refinado.

Parâmetro	R ²	RMSEP	RPD
K270	69.44	0.211	1.09
K230	89.15	1.58	1.47

Observando as Tabelas 4.4 e 4.5, os modelos que apresentam melhores capacidades preditivas correspondem aos modelos do ácido gordo C18:2 e do K230 (R^2 e RPD).

Para este óleo, acedeu-se a um maior número de amostras comparativamente aos óleos abordados anteriormente.

No entanto, todos os modelos apresentados podem ser otimizados. É importante a contínua atualização e testes aos modelos com o objetivo de garantir a sua robustez e a deteção com precisão de amostras fora das especificações.

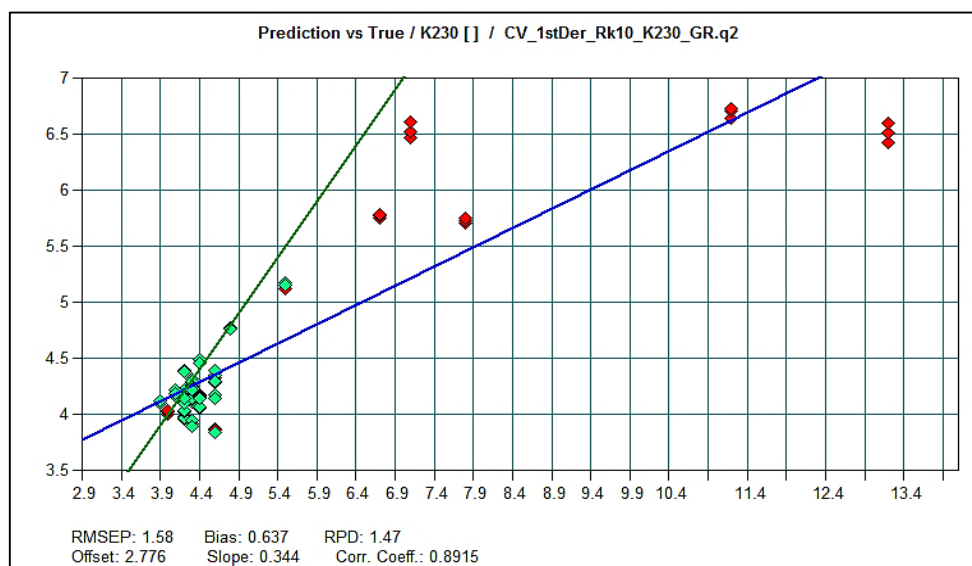


Figura 4.3 - Ilustração do teste feito para o K230 do óleo de girassol refinado.

A Figura 4.3 exemplifica o teste realizado ao modelo do parâmetro K230. Observa-se a presença de amostras consideradas como outliers de acordo com o software do equipamento.

Tal como foi dito anteriormente, o software tem a capacidade de identificar outliers, ou seja, valores atípicos, indicando que tais pontos apresentam um desvio maior do que 99.9% face à previsão.

A deteção automática de outliers por parte do software é usada para assinalar as amostras cujo desvio em relação ao valor verdadeiro da concentração é particularmente elevado e estatisticamente significativo.

Como última análise do gráfico, observa-se que as amostras consideradas atípicas são as que apresentam valores relativamente “altos” do parâmetro em questão, embora estejam dentro dos limites admitidos para o parâmetro conforme os regulamentos dos óleos vegetais.

Como perspetiva futura, embora o modelo do parâmetro K230 apresente resultados satisfatórios, realizar uma calibração com o mesmo grupo de amostras, que têm uma maior variabilidade de valores, verificando se o software as identifica como amostras de calibração más, que podem

ser reconhecidas por os seus verdadeiros valores serem previstos. Caso seja permitido, proceder á calibração do modelo e usar outro grupo de amostras para a sua validação.

Finalizando, constatou-se que por vezes a divisão em grupos de amostras pode levar com que o modelo desenvolvido para determinado parâmetro tenha um número de amostras reduzido e/ou com pouca variabilidade tendo em consideração a baixa variação geográfica da semente.

Assim, deverá estar sempre presente o contínuo aperfeiçoamento dos modelos para os óleos vegetais e azeites, com novas entradas ou lotes, analisadas pelos métodos de referência e sendo adicionadas ao modelo de calibração.

4.2. Validação do Método

Quando se procede ao desenvolvimento de novos métodos é necessário provar que estes são apropriados para a função pretendida, ou seja, realiza-se uma validação.

Consoante o método em causa, devem ser estudadas várias medidas de desempenho para que seja feita a sua validação, tais como, a gama de trabalho, seletividade, limiares analíticos (deteção e quantificação), exatidão, precisão, incerteza, entre outros.

Para proceder á validação foi analisada a exatidão do método interno relativamente ao método de referência (laboratório). [34]

4.2.1. Testes Comparativos

Como objetivo principal deste tipo de ensaio comparativo é o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, a avaliação da exatidão do método interno relativamente ao método de referência.

Na prática efetuam-se análises em replicado, usando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras. Este estudo poderá ser feito numa gama restrita de concentrações ou em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método. [34]

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, nomeadamente:

- Teste de hipótese: teste t das médias;
- Teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio;
- Teste de hipótese: teste t das diferenças (amostras emparelhadas).

Teste t das médias

Este teste aplica-se quando se pretende comparar dois métodos de análise sobre a mesma amostra. Não exige que o número de amostras seja igual para ambos os métodos, pois o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelas duas metodologias é feito em torno da média dos valores.

Teste de Regressão linear entre dois métodos de ensaio

Este teste é recomendado para quando se pretende comparar dois métodos de análise em gamas mais alargadas de concentração, ou seja, quando se deseja validar um método em toda a sua gama de trabalho.

Teste t das diferenças (amostras emparelhadas)

A aplicação deste teste tem como objetivo a comparação de dois métodos sobre amostras iguais ou similares, na mesma gama de concentração, pois assenta no pressuposto que quais quer erros aleatórios e/ ou sistemáticos são independentes da concentração.

Este teste exige que o número de ensaios seja igual para ambos os métodos, pois no presente caso o estudo é feito em torno das diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos para cada amostra analisada.

Relativamente aos três testes abordados anteriormente, irá ser aplicado o teste t das diferenças no trabalho a desenvolver, para a validação do método interno FT-NIR.

De seguida, irá ser feita uma descrição mais pormenorizada do teste em questão e as fórmulas a aplicar.

O teste t das diferenças pressupõe a comparação entre dois valores de t, o t experimental designado por t_{exp} , e o t tabelado designado por t_{tab} , sendo tomado como critério de aceitação:

$$t_{exp} \leq t_{tab}$$

Conclui-se que os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na prática o t_{exp} é obtido do seguinte modo:

- a) Recolhem-se os resultados dos ensaios obtidos pelos dois métodos (1 e 2) para cada amostra ensaiada;
- b) Calculam-se as diferenças (D_i) entre os resultados emparelhados obtidos pelos dois métodos para cada amostra. Calcula-se de seguida a média aritmética (D_m) destas diferenças;
- c) Calcula-se o t_{exp} pela seguinte equação:

$$t_{exp} = \frac{D_m}{S_m} \cdot \sqrt{N} \quad \text{Eq. 20}$$

em que:

N = nº de amostras ensaiadas pelos dois métodos;

D_m = Média aritmética das diferenças (D_i);

S_m = Desvio padrão associado à média das diferenças (D_i).

- d) Compara-se o t_{exp} (em valor absoluto) com o t_{tab} , para um determinado grau de confiança e ($N-1$ graus de liberdade).

Conclusão: os resultados provenientes dos dois métodos, estatisticamente, não apresentam desvios significativos se o t_{exp} (em valor absoluto) for inferior ou igual ao t_{tab} .

Na prática, para testar a exatidão dos métodos, os resultados foram avaliados através de um teste *t-student*.

Os testes *t-student* são vistos como testes de significância, isto é, permitem verificar se as diferenças entre os resultados dos dois métodos são estatisticamente significativas.

Quando se executa um teste de hipóteses existem dois tipos de erros presentes, os Erros do tipo I e do tipo II.

Se rejeitarmos uma hipótese nula quando ela deveria ser aceite, dizemos que foi cometido um erro do tipo I. Se aceitarmos uma hipótese quando ela deveria ser rejeitada, cometemos um erro do tipo II.

A validade dos testes de hipóteses exige que estes sejam definidos, para minimizar os dois tipos de erros.

Porém, não se podem diminuir os dois erros simultaneamente, ou seja, a tentativa de reduzir o erro de um tipo é geralmente acompanhada por um erro de outro tipo.

Para o teste em estudo, estamos a considerar a diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos, calculando o parâmetro D_m , que consiste na média aritmética das diferenças, que irá entrar no cálculo do valor do t_{exp} , que será avaliado com o valor de t_{tab} de acordo com o critério

de aceitação delineado. Deste modo, poderemos afirmar que estamos a fazer um teste á média, μ , definindo as hipóteses nula e alterativa do teste de hipóteses:

- $H_0: \mu = 0$
- $H_1: \mu \neq 0$

A hipótese nula afirma que não existem diferenças entre o método interno, FT-NIR, e o método de referência (laboratório). Os dois métodos têm a mesma proximidade de resultados, isto é, a mesma exatidão.

A hipótese alternativa, é testada contra a hipótese nula, afirmando que existem diferenças entre os dois métodos, ou seja, o método interno não tem uma boa proximidade dos resultados face aos resultados do método de referência.

Para tomar a decisão de rejeitar H_0 , calcula-se o valor de t_{tab} (tabela t-student), e para os t_{exp} , caso esse t for maior em módulo ao t_{tab} , rejeita-se a hipótese nula levando a concluir que os resultados provenientes dos dois métodos apresentam desvios significativos. [34]

No âmbito do trabalho e no controlo de qualidade, não é admitido cometer um erro do tipo II, isto é, considerar que o método interno tem a mesma exatidão relativamente ao método de referência, quando na realidade não é verdade e apresenta diferenças significativas nos resultados dos parâmetros (Erro tipo II: Não rejeitar H_0 | H_0 é falso). [35]

Um parâmetro estatístico importante nos testes de hipóteses é o nível de significância, que se deve ter especial atenção na escolha do seu valor.

Na escolha do nível de significância para o teste a aplicar, optou-se por ponderar entre 1% - 0.5%. [34]

Foi utilizada, para o teste t-student, uma significância de 0.5%.

Para o nível de significância de 0.5% e para N-1 graus de liberdade, retira-se da tabela estatística t-student o valor de t_{tab} ($t_{\text{tab}} = 3.2498$).

No subcapítulo seguinte serão discutidos todos os resultados obtidos da aplicação do teste t das diferenças para amostras analisadas pelos dois métodos (FT-NIR e Laboratório) para os óleos vegetais soja e girassol (refinados e crus) e para o azeite virgem extra.

4.2.2. Resultados do Teste t das diferenças (amostras emparelhadas)

1) Óleo de soja cru

Em relação ao óleo de soja cru, os resultados estatísticos encontram-se resumidos nas Tabelas 4.6 e 4.7.

Tabela 4.6 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para a acidez do óleo de soja cru.

Parâmetros estatísticos	Acidez (%)
D_m	0.05
S_m	0.051
t_{exp}	3.10

Tabela 4.7 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os ácidos gordos do óleo de soja cru.

Parâmetros estatísticos	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)	C24:0 (%)
D_m	0.01	0.745	0.005	0.07	0.755	0.395	0.28	0.01	0.02	0.030	0.02
S_m	0.007	0.448	0.016	0.454	0.166	1.527	0.159	0.033	0.023	0.032	0.036
t_{exp}	4.29	5.26	0.98	0.49	14.42	0.82	5.57	0.94	2.73	2.44	1.77

Foram realizados no total 12 testes para os parâmetros do óleo de soja cru. Dos 12, foram aceites consoante o critério de aceitação, $t_{exp} \leq t_{tab}$, 8 resultados. Querendo isto dizer, que as diferenças entre ambos os métodos não são significativas, havendo evidências estatísticas para não rejeitar

a hipótese H_0 . O método FT-NIR tem uma exatidão semelhante ao método de referência, podendo ser usado no controle de qualidade dos parâmetros aceites no teste realizado.

2) Óleo de girassol cru

Em relação ao óleo de girassol cru, os resultados estatísticos do teste estão resumidos nas Tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para a acidez do óleo de girassol cru.

Parâmetros estatísticos	Acidez (%)
D_m	0.2
S_m	0.114
t_{exp}	5.57

Tabela 4.9 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os ácidos gordos do óleo de girassol cru.

Parâmetros estatísticos	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)	C24:0 (%)
D_m	0.00	0.03	0.05	0.40	0.10	0.23	0.01	0.02	0.01	0.03	0.04
S_m	0.005	0.279	0.035	0.114	0.766	0.155	0.042	0.014	0.011	0.060	0.039
t_{exp}	0.00	0.40	4.46	11.11	0.41	4.60	0.76	4.47	3.00	1.60	3.25

Foram realizados no total 12 testes para os parâmetros do óleo de girassol cru. Dos 12, foram considerados aceites consoante o critério de aceitação, $t_{exp} \leq t_{tab}$, 7 resultados. Ou seja, os 7 resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos, havendo evidências estatísticas para não rejeitar a hipótese H_0 .

O método FT-NIR tem uma exatidão semelhante ao método de referência, podendo ser usado no controle de qualidade dos parâmetros.

3) Óleo de girassol refinado

Nas Tabelas 4.10 e 4.11, encontram-se resumidos os resultados estatísticos.

Tabela 4.10 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para a acidez do óleo de girassol refinado.

Parâmetros estatísticos	Acidez (%)	K230	K270
D_m	0.002	0.125	0.05
S_m	0.008	0.150	0.148
t_{exp}	0.77	2.64	1.07

Tabela 4.11 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os ácidos gordos do óleo de girassol refinado.

Parâmetros estatísticos	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)	C24:0 (%)
D_m	0.002	0.318	0.015	0.19	0.10	0.01	0.02	0.005	0.010	0.010	0.015
S_m	0.004	0.195	0.012	0.04	0.15	0.12	0.004	0.01	0.01	0.04	0.02
t_{exp}	1.5	5.17	4.09	15.69	2.16	0.33	14.06	1.59	4.29	0.82	2.03

No total foram feitos 14 testes para os parâmetros do óleo de girassol refinado. Dos 14, foram aceites consoante o critério de aceitação definido, 9 parâmetros. Portanto, verificou-se que existe proximidade entre os resultados de ambos os métodos para os 9 parâmetros, querendo isto dizer que não se rejeita a hipótese H_0 do teste.

4) Óleo de soja refinado

Em relação ao óleo de soja refinado, os resultados estatísticos do teste t-student encontram-se resumidos nas Tabelas 4.12 e 4.13.

Tabela 4.12 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para a acidez do óleo de soja refinado.

Parâmetros estatísticos	Acidez (%)	K230	K270
D_m	0.001	0.60	0.45
S_m	0.005	0.140	0.227
t_{exp}	0.65	13.57	3.17

Tabela 4.13 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os ácidos gordos do óleo de soja refinado

Parâmetros estatísticos	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)	C24:0 (%)
D_m	0.004	0.36	0.01	0.03	0.33	0.27	0.05	0.03	0.06	0.05	0.01
S_m	0.017	0.527	0.367	0.099	0.161	0.205	0.202	0.023	0.011	0.025	0.014
t_{exp}	0.74	2.16	0.09	0.96	6.46	4.17	0.82	4.16	17.91	6.45	2.31

Foram realizados 14 testes para os parâmetros do óleo de soja refinado. Dos 14, foram aceites consoante o critério de aceitação definido, 8 parâmetros. Portanto, verificou-se que existe proximidade entre os resultados de ambos os métodos para os 8 parâmetros.

5) Azeite Virgem Extra

Em relação ao azeite virgem extra, os resultados estatísticos do teste t-student encontram-se resumidos nas Tabelas 4.14, 4.15 e 4.16.

Os resultados são referentes aos seguintes parâmetros do azeite: Acidez, Índice de Peróxidos, Ácidos Gordos e Esteróis.

Tabela 4.14 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para a acidez, peróxidos e absorvâncias no UV do azeite virgem extra.

Parâmetros estatísticos	Acidez (%)	Peróxidos (meq O_2 /kg)	K230	K270
D_m	0.04	1.10	0.02	0.18
S_m	0.039	0.693	0.037	0.133
t_{exp}	3.24	5.01	1.71	4.27

Tabela 4.15 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os ácidos gordos do azeite virgem extra.

Parâmetros estatísticos	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C16:1 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:0 (%)	C20:1 (%)	C22:0 (%)	C24:0 (%)
D_m	0.00	1.83	0.21	0.40	0.40	0.58	0.01	0.09	0.01	0.01	0.01
S_m	0.003	0.367	0.076	0.579	0.579	0.290	0.036	0.044	0.022	0.015	0.010
t_{exp}	0.00	15.79	8.49	2.18	2.19	6.33	0.87	6.40	0.93	2.14	3.06

Em relação aos resultados apresentados nas tabelas, dos 15 testes foram aceites 9 parâmetros, ou seja, o $t_{exp} \leq t_{tab}$. Os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos, havendo evidências estatísticas para não rejeitar a hipótese H_0 .

Tabela 4.16 - Resultados dos principais parâmetros estatísticos do teste t para os esteróis do azeite virgem extra.

Parâmetros estatísticos	Estigmasterol	Campesterol	β -Sitoesterol	Δ -7-Estigmasterol	Eritrodiol + Uvaol	Esteróis Totais
D_m	0.20	0.25	0.25	0.06	0.25	281.50
S_m	0.242	0.103	0.218	2.64	0.337	63.68
t_{exp}	2.62	7.65	3.62	0.069	2.35	13.98

A Tabela 4.16 resume os resultados obtidos para os esteróis. Dos 6 testes e de acordo com o critério $t_{exp} \leq t_{tab}$, foram aceites 3. Os três testes aceites são referentes ao Estigmasterol, β -Sitoesterol e Eritrodiol + Uvaol.

Para os parâmetros aceites de acordo com o critério de aceitação estabelecido, apresentam uma exatidão idêntica ao método de referência, podendo o método interno ser usado no controlo de qualidade dos parâmetros.

Contudo, na utilização deste tipo de testes, é importante refletir sobre a sua significância prática. Tendo como exemplo os parâmetros do óleo de girassol refinado e do azeite virgem extra que foram rejeitados pelo teste justificando que não continham a exatidão necessária comparativamente ao método de referência, os valores dos seus parâmetros encontram-se dentro dos limites aceitáveis de acordo com as especificações.

Na prática, o método interno pode ser utilizado, pois as diferenças não são significativas do ponto de vista do controlo de qualidade, complementando os métodos de referência.

4.3. Estudo da Precisão do método

Existem duas medidas extremas que permitem avaliar a dispersão de resultados, sendo designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia que geralmente varia com a gama de concentrações. [36]

A precisão do método FT-NIR, ou seja, a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, foi realizada de acordo com as definições apresentadas no *Guia Relacre: Validação de Métodos Internos de Ensaio de Análise Química para o estudo da precisão do método*. [36]

A repetibilidade corresponde a uma característica de desempenho que avalia a precisão de um determinado método, ou seja, exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas. Refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível.

Condições a aplicar na avaliação da precisão de um método:

- Mesmo laboratório;
- Mesmo analista;
- Mesmo equipamento;
- Mesmo tipo de reagentes;
- Curtos intervalos de tempo.

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio Laboratório, efetuam-se uma série de medições ($n \geq 10$) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições definidas. Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração, cobrindo todo o domínio de aplicação do método. Quando se pretende avaliar através de um ensaio interlaboratorial, o número de medições, em cada nível de concentrações, poderá ser inferior ($n \geq 2$). Em ambos os casos, o cálculo é efetuado separadamente para cada nível de concentração i , a partir dos resultados obtidos e eliminando os valores aberrantes.

O limite de repetibilidade, r , é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i , X_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas.

Na prática são aceites resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade, $|X_i - X_{i-1}| \leq r$. Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite,

dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios.

Para um nível de confiança de 95 %, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo:

$$r = t \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} = 1,96 \cdot \sqrt{2} \cdot S_{ri} \quad \text{Eq. 21}$$

Sendo:

S_{ri} – Desvio padrão de repetibilidade associada aos resultados considerados;

Isto é:

$$r = 2,8 \cdot \sqrt{S_{ri}^2} \quad \text{Eq. 22}$$

O coeficiente de variação de repetibilidade, **CV_r**, para cada nível de concentrações, sendo expresso em percentagem é dado:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} * 100 \quad \text{Eq. 23}$$

Sendo:

CV_r – numericamente igual ao desvio padrão de repetibilidade a dividir pela média dos valores considerados.

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos da repetibilidade para o método interno FT-NIR para o óleo de girassol refinado e para o Azeite virgem extra.

Óleo de girassol refinado

Para o óleo de girassol refinado o estudo da repetibilidade foi aplicado para os seguintes parâmetros: Acidez (%) e Absorvâncias no UV (K230 e K270).

Estes parâmetros correspondem a parâmetros qualitativos, isto é, estão associados à determinação da qualidade dos óleos vegetais.

Para o estudo da repetibilidade, repetiu-se a análise das amostras 10 vezes, calculando a média e o desvio padrão para posteriormente se calcular, para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade (r) e o coeficiente de variação (CV_r).

As Tabelas 4.17 e 4.18 resumem, sucintamente, os resultados obtidos para a acidez e absorvâncias no UV.

Tabela 4.17 - Cálculo da média e desvio-padrão para o estudo da repetibilidade para a acidez do óleo de girassol refinado.

Nº de Amostra	% Ácido oleico
1	0,031
2	0,030
3	0,029
4	0,028
5	0,029
6	0,030
7	0,029
8	0,029
9	0,030
10	0,028
Média	0,03
Desvio Padrão	0,001

Tabela 4.18 - Cálculo da média e desvio-padrão para o estudo da repetibilidade para as absorvâncias no UV do óleo de girassol refinado.

Nº de Amostra	K230	K270
1	3,96	1,42
2	3,95	1,60
3	3,94	1,47
4	3,89	1,62
5	3,90	1,50
6	3,89	1,50
7	3,93	1,47
8	3,84	1,31
9	3,94	1,45
10	3,87	1,53
Média	3,91	1,49
Desvio Padrão	0,041	0,089

Aplicando as fórmulas da repetibilidade, obtiveram-se os seguintes resultados.

Tabela 4.19 - Resultados do estudo da repetibilidade para a acidez e absorvâncias no UV do óleo de girassol refinado.

Parâmetro	Limite de repetibilidade (r)	Cv _r
Acidez (%)	0.02	2.62
Absorvância UV – K230	0.12	1.06
Absorvância UV – K270	0.25	6.01

Azeite Virgem Extra

Para o azeite virgem extra, o estudo da repetibilidade foi aplicado para os seguintes parâmetros: Acidez (%), Índice de Peróxidos (meq O_2 /kg) e as Absorvâncias no UV (K232 e K270).

A acidez relaciona-se com o grau de desagregação dos triacilgliceróis, devido a reações químicas de hidrólise ou lipólise, formando-se desta forma os ácidos gordos livres.

O índice de peróxidos permite avaliar a oxidação do azeite, pois os peróxidos são produtos primários da oxidação do azeite. [37]

Os azeites são oxidados quando entram em contato com o oxigénio que pode existir no espaço superior do recipiente onde se encontra condito e nele se dissolve. Os produtos de oxidação têm um sabor e odor desagradável e podem afetar negativamente o valor nutricional do azeite.

Na avaliação dos coeficientes de extinção específicos (K232 e K270), é possível verificar o grau de oxidação do azeite, complementando assim as observações para o índice de peróxidos.

Todos estes parâmetros são qualitativos, isto é, relacionam-se com a qualidade do azeite. [37]

Para o estudo da repetibilidade procedeu-se de modo igual ao que foi explicado para o óleo de girassol.

De seguida, serão apresentados os resultados obtidos da repetibilidade para o azeite virgem extra.

Tabela 4.20 - Cálculo da média e desvio-padrão para o estudo da repetibilidade para a acidez do azeite virgem extra.

Nº de Amostra	% Ácido oleico
1	0,170
2	0,158
3	0,180
4	0,157
5	0,163
6	0,166
7	0,157
8	0,167
9	0,159
10	0,158
Média	0,16
Desvio Padrão	0,007

Tabela 4.21 - Cálculo da média e desvio-padrão para o estudo da repetibilidade para as absorvâncias no UV do azeite virgem extra.

Nº de Amostra	Índice de Peróxidos (meq O_2 /kg)	K230	K270
1	4,75	0,12	1,55
2	4,68	0,13	1,57
3	4,93	0,13	1,58
4	4,54	0,12	1,57
5	4,51	0,13	1,57
6	5,09	0,13	1,57
7	5,17	0,13	1,57
8	5,17	0,12	1,54
9	4,75	0,12	1,58
10	5,22	0,11	1,58
Média	4,84	0,12	1,57
Desvio Padrão	0,271	0,008	0,013

Tabela 4.22 - Resultados do estudo da repetibilidade para a acidez e absorvâncias no UV do azeite virgem extra.

Parâmetro	Limite de repetibilidade (r)	CVr
Acidez (%)	0.02	4.61
Índice de Peróxidos (meq O_2 /kg)	0.76	5.60
Absorvância UV – K232	0.02	6.35
Absorvância UV – K270	0.04	0.82

A avaliação da precisão do método interno, isto é, o grau de concordância entre os valores medidos obtidos por medições repetidas, demonstrou que o equipamento tem baixa dispersão entre resultados.

Embora índice de peróxidos seja um parâmetro com tendência a ter maior variação ao longo do tempo, as amostras usadas eram novas, ou seja, tinham sido acabados de produzir na fábrica.

4.3.1. Comparação da Precisão entre métodos

Quando se pretende avaliar se dois métodos têm diferenças significativas entre si, em termos de precisão, pode-se recorrer ao teste F. Este baseia-se no cálculo da razão (PG) entre variâncias dos dois métodos.

Estas variâncias devem ser colocadas de modo a que a razão PG seja maior ou igual a um. Em seguida é comparado o valor desta razão com o valor de *F de Snedecor* (Distribuição de Fisher), atendendo aos graus de liberdade em questão. Se $PG \leq F$, os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões. [36]

Para a comparação da precisão entre os dois métodos de análise, aplicou-se a distribuição de Fisher, calculado o valor de F e a razão PG expressa pela seguinte fórmula:

$$PG = \frac{SA^2}{SB^2} \quad \text{Eq. 24}$$

Na Tabela 4.23, tem-se o resultado da comparação da precisão entre ambos os métodos para a acidez do óleo de girassol refinado.

Tabela 4.23 - Resultados da comparação da precisão entre os métodos para a Acidez.

Parâmetro	Variância (S ²)	PG
Método Interno	5.8E-07	1.33
Método de Referência	4.4E-07	

A comparação de métodos foi obtida na sequência de um estágio que decorreu no período deste trabalho. [38].

Através da distribuição de Fisher e tendo com conta os graus de liberdade, para um nível de significância de 5%, tem-se o seguinte resultado: $F = 3.179$.

Logo, $PG \leq F$ para o parâmetro da Acidez. Os dois métodos não apresentam diferenças significativas entre si, relativamente às suas precisões.

4.4. Misturas

Sendo os óleos vegetais fundamentalmente constituídos por triacilglicerídeos será legítimo pensar que o seu conjunto em cada óleo corresponderá a um perfil típico. Alguns óleos apresentam composições semelhantes em ácidos gordos e não podem ser facilmente diferenciados. [39]

O controlo de qualidade de óleos alimentares baseado na determinação dos ácidos gordos é frequentemente prejudicado pelo fato de que os valores obtidos poderem encontrar-se dentro dos intervalos quantitativos aceites, apesar de adulteração. Alguns óleos apresentam composições semelhantes em ácidos gordos e não podem ser facilmente diferenciados.

Tal diferenciação exige análises comparativas sistemáticas de esteróis, tocoferóis, entre outros. [39]

4.4.1. Ensaio Piloto

Tendo em consideração a técnica (FT-NIR) estudada no presente trabalho, iniciou-se o estudo de misturas de óleos vegetais e azeite virgem extra com a finalidade de análises de amostras de controlo destes produtos.

O ensaio piloto consistiu na realização de misturas, de acordo com as seguintes especificações estabelecidas e estão exemplificadas na Figura 4.4.

GIR	SOJA		SOJA	GIR
100	0		100	0
99	1		99	1
98	2		98	2
97	3		97	3
96	4		96	4
95	5		95	5
90	10		90	10
85	15		85	15
80	20		80	20
75	25		75	25

Figura 4.4 - Percentagens das misturas de óleos vegetais do ensaio piloto.

Todas as misturas foram bem homogeneizadas e adquiriram-se os espectros dos lotes individualmente e de todas as misturas. Todo o conjunto de espectros encontra-se no Anexo D.

De seguida, será feita a discussão dos resultados obtidos das misturas consoante as três etapas do trabalho desenvolvido.

Parte A

Inicialmente foram elaboradas misturas com lotes de óleo de soja e de girassol, perfazendo um total de 100 ml para cada uma.

As amostras foram analisadas no FT-NIR com a finalidade de testar se o equipamento seria sensível às alterações presentes. O ideal seria obter indicação da alteração na composição dos ácidos gordos nos óleos de soja e de girassol à medida que fosse aumentada a percentagem de mistura.

Tomando como exemplo, o caso da mistura soja-girassol, em primeiro lugar analisou-se o lote soja e depois o lote de girassol, adquirindo cada espectro individualmente.

Respeitando a ordem da elaboração das misturas, procedeu-se à análise de acordo com as percentagens, nomeadamente, 99 – 75%. Sendo o óleo de soja o composto maioritário utilizou-se os modelos referentes a este óleo. O mesmo foi feito para os restantes óleos e azeite.

Durante as medições, observou-se que os resultados dos ácidos gordos, à medida que se aumentava as percentagens de mistura, eram considerados aceites por parte dos modelos inseridos no sistema não demonstrando sensibilidade face às alterações.

Por forma a contornar esta situação, pois o equipamento não demonstrou ter a sensibilidade esperada durante as medições, tomou-se a decisão de selecionar os ácidos gordos que tivessem alterações significativas.

Assim, concluiu-se que os ácidos gordos que tiveram alterações significativas na mistura foram os ácidos gordos C18:1, C18:2.

Os dados colecionados relativos à parte A encontram-se no Anexo D.

Parte B

Como segunda parte do ensaio piloto, recolheram-se amostras de novos lotes de soja e girassol, procedendo de forma igual ao que foi explicado anteriormente.

Tendo sido identificados os ácidos gordos com alterações, analisou-se a partir de que percentagem estas seriam significativas.

As Tabelas 4.24 e 4.25 resumem, sucintamente, os resultados obtidos

Tabela 4.24 - Resultados da análise da mistura dos óleos de soja-girassol que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Girassol (100ml)	S (96ml) G (4ml)	S (95ml) G (5ml)	S (90ml) G (10ml)	S (85ml) G (15ml)	S (80ml) G (20ml)	S (75ml) G (25ml)
C14:0	0.0625	0.0749	0.0634	0.0616	0.0615	0.0631	0.0631	0.0631
C16:0	11.123	6.854	10.918	10.786	10.546	10.388	9.898	9.765
C16:1	0.0738	0.1143	0.0706	0.0744	0.0762	0.0761	0.0778	0.081
C18:0	3.487	3.086	3.567	3.445	3.487	3.424	3.397	3.369
C18:1	26.145	32.194	26.199	26.436	26.936	27.167	27.395	27.899
C18:2	51.226	56.125	51.504	51.388	51.937	51.945	52.145	52.329
C18:3	5.573	0.059	5.296	5.316	4.978	4.718	4.382	4.159
C20:0	0.3715	0.2401	0.352	0.353	0.403	0.323	0.3576	0.3193
C20:1	0.2297	0.1347	0.2464	0.2394	0.2382	0.2532	0.2614	0.2658
C22:0	0.4266	0.6859	0.4345	0.4296	0.4327	0.4369	0.4313	0.4266
C24:0	0.1201	0.2309	0.1290	0.1312	0.1285	0.1384	0.1434	0.1437

Tabela 4.25 - Resultados da análise da mistura dos óleos de girassol-soja que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Girassol (100ml)	G (96ml) S (4ml)	G (95ml) S (5ml)	G (90ml) S (10ml)	G (85ml) S (15ml)	G (80ml) S (20ml)	G (75ml) S (25ml)
C14:0	0.0625	0.0749	0.0762	0.0761	0.0768	0.0777	0.0787	0.0807
C16:0	11.123	6.854	6.961	7.013	7.015	7.0613	7.1955	7.271
C16:1	0.0738	0.1143	0.1142	0.1128	0.1083	0.1026	0.1035	0.101
C18:0	3.487	3.086	3.248	3.161	3.235	3.293	3.387	3.474
C18:1	26.145	32.194	31.681	31.621	31.197	30.78	30.308	29.851
C18:2	51.226	56.125	56.405	56.492	56.757	57.118	57.507	57.748
C18.3	5.573	0.059	0.058	0.060	0.061	0.063	0.057	0.064
C20:0	0.3715	0.2401	0.2412	0.2432	0.2436	0.2467	0.2442	0.2482
C20:1	0.2297	0.1347	0.1479	0.1535	0.1529	0.1588	0.1615	0.1672
C22:0	0.4266	0.6859	0.6994	0.7000	0.6950	0.6883	0.6822	0.6938
C24:0	0.1201	0.2309	0.226	0.221	0.220	0.2164	0.2127	0.2028

A partir do conjunto de resultados adquiridos para as misturas anteriores será definido um critério que permita facilitar o processo de análise de amostras de controlo para análise em laboratório e decisão, nomeadamente, ao perfil de ácidos gordos avaliando a sua autenticidade.

O mesmo será feito para as misturas feitas na Parte C do ensaio piloto onde se incluiu um novo lote relativo ao azeite virgem extra.

Parte C

Por fim, e como terceira parte, adicionou-se às misturas um lote de azeite virgem extra.

Foram colecionadas as seguintes misturas: Azeite – Soja; Azeite – Girassol; Soja – Azeite; Girassol – Azeite.

Foi novamente feito o teste para detetar a sensibilidade do equipamento em relação às alterações impostas para os modelos referentes ao azeite, e como esperado, não houve qualquer tipo de sensibilidade.

Selecionou-se os ácidos gordos que mostraram alterações ao longo das medições e a partir de que percentagem de mistura se observou estas serem significativas.

As Tabelas 4.26 e 4.27 resumem os resultados fornecidos pelo equipamento para as percentagens de misturas significativas, para as misturas soja – azeite e azeite – soja.

Tabela 4.26 - Resultados da análise da mistura de óleo de soja-azeite que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Azeite (100ml)	S (95ml) A (5ml)	S (90ml) A (10ml)	S (85ml) A (15ml)	S (80ml) A (20ml)	S (75ml) A (25ml)
C14:0	0.0625	0.0071	0.0645	0.0701	0.0744	0.0782	0.0834
C16:0	11.123	12.30	10.989	10.883	10.736	10.665	10.383
C16:1	0.0738	0.8304	0.0833	0.0942	0.1039	0.1175	0.1323
C18:0	3.487	3.056	3.485	3.517	3.472	3.445	3.378
C18:1	26.145	78.693	29.503	31.341	34.261	37.132	40.063
C18:2	51.226	4.255	48.451	46.819	44.069	41.615	38.924
C18.3	5.573	0.6549	5.075	4.733	4.287	3.908	3.409
C20:0	0.3715	0.3917	0.3608	0.3809	0.3798	0.3842	0.4097
C20:1	0.2297	0.2102	0.2572	0.2759	0.3017	0.3253	0.3541
C22:0	0.4266	0.1086	0.5109	0.5572	0.6178	0.6773	0.7524
C24:0	0.1201	0.0418	0.1299	0.1344	0.1498	0.1599	0.1638

Os ácidos gordos com alterações significativas na mistura Soja – Azeite foram os ácidos gordos, C18:1, C18:2.

A percentagem de mistura considerada significativa foi a de 95 – 5%, dado que a partir desta se adquiriu alterações relevantes nos ácidos gordos mencionados.

Tabela 4.27 - Resultados da análise da mistura do azeite-óleo de soja que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Azeite (100ml)	A (95ml) S (5ml)	A (90ml) S (10ml)	A (85ml) S (15ml)	A (80ml) S (20ml)	A (75ml) S (25ml)
C14:0	0.0625	0.0071	0.0099	0.0138	0.0153	0.0189	0.0219
C16:0	11.123	12.30	12.469	13.015	13.778	14.429	15.090
C16:1	0.0738	0.8304	0.9127	0.9427	1.0977	1.162	1.277
C18:0	3.487	3.056	2.906	2.616	2.535	2.234	2.095
C18:1	26.145	78.693	75.171	72.566	67.855	64.601	61.650
C18:2	51.226	4.255	7.148	9.692	13.141	15.778	18.402
C18:3	5.573	0.6549	0.666	0.7356	0.7238	0.776	0.791
C20:0	0.3715	0.3917	0.3995	0.4389	0.4528	0.4859	0.4781
C20:1	0.2297	0.2102	0.2450	0.2906	0.3258	0.3689	0.4096
C22:0	0.4266	0.1086	0.1139	0.1188	0.1264	0.1310	0.1365
C24:0	0.1201	0.0418	0.0463	0.0485	0.0507	0.0525	0.0563

Tal como referido anteriormente para a mistura Soja – Azeite, os ácidos gordos com alterações significativas para a mistura Azeite – Soja foram os ácidos gordos C18:1 e C18:2.

É importante lembrar que para cada mistura selecionou-se os modelos dos óleos maioritários.

A seguir, na Tabela 4.28, serão apresentados os resultados adquiridos para as percentagens das misturas significativas, para as misturas girassol – azeite e azeite – girassol.

Tabela 4.28 - Resultados da análise da mistura do óleo de girassol-azeite que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Azeite (100ml)	G (95ml) A (5ml)	G (90ml) A (10ml)	G (85ml) A (15ml)	G (80ml) A (20ml)	G (75ml) A (25ml)
C14:0	0.0749	0.0071	0.0693	0.0662	0.0677	0.0653	0.0615
C16:0	6.854	12.30	6.878	6.946	6.936	6.956	6.920
C16:1	0.1143	0.8304	0.118	0.119	0.123	0.124	0.125
C18:0	3.086	3.056	3.029	2.954	2.881	2.921	2.924
C18:1	32.194	78.693	35.547	38.295	40.860	43.01	45.502
C18:2	56.125	4.255	52.673	49.631	46.976	44.746	42.198
C18:3	0.059	0.6549	0.061	0.056	0.058	0.057	0.061
C20:0	0.2401	0.3917	0.2363	0.2480	0.2512	0.2561	0.2527
C20:1	0.1347	0.2102	0.1209	0.1409	0.1565	0.1595	0.1669
C22:0	0.6859	0.1086	0.7268	0.7920	0.8257	0.8593	0.8833
C24:0	0.2309	0.0418	0.2452	0.2499	0.2392	0.2542	0.2421

Para a mistura girassol – azeite, conclui-se que os ácidos gordos mais significativos seriam os ácidos gordos C18:1, C18:2. A percentagem de mistura escolhida foi a de 95-5%.

Por último, encontram-se resumidos na Tabela 4.29 os resultados da última mistura desta parte do trabalho.

Trata-se da mistura azeite – girassol, para uma percentagem de 95-5% identificando-se os ácidos gordos principais.

Tabela 4.29 - Resultados da análise da mistura do azeite-óleo de girassol que apresentaram alterações significativas do perfil de ácidos gordos.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Azeite (100ml)	A (95ml) G (5ml)	A (90ml) G (10ml)	A (85ml) G (15ml)	A (80ml) G (20ml)	A (75ml) G (25ml)
C14:0	0.0749	0.0071	0.0095	0.0123	0.0137	0.0163	0.021
C16:0	6.854	12.30	12.46	12.713	12.849	13.088	13.155
C16:1	0.1143	0.8304	0.9337	0.9572	1.0022	0.9929	0.9682
C18:0	3.086	3.056	2.945	2.790	2.659	2.535	2.434
C18:1	32.194	78.693	75.47	72.72	69.42	67.34	64.54
C18:2	56.125	4.255	6.919	9.616	12.322	14.502	17.38
C18:3	0.059	0.6549	0.6585	0.6959	0.7027	0.7339	0.7639
C20:0	0.2401	0.3917	0.4089	0.4281	0.4616	0.4606	0.4818
C20:1	0.1347	0.2102	0.2542	0.2946	0.3128	0.3511	0.4049
C22:0	0.6859	0.1086	0.1136	0.1187	0.1237	0.1291	0.1330
C24:0	0.2309	0.0418	0.0459	0.0474	0.0491	0.0499	0.0525

4.4.2. Critérios para as análises de misturas

Objetivo

Estabelecer, com base nos resultados experimentais do perfil de ácidos gordos obtidos pela metodologia FT-NIR, para misturas com diferentes proporções de óleos vegetais e/ou azeite, critérios que possam servir de base a uma decisão do laboratório no que se refere à aceitação, rejeição ou necessidade de efetuar análises pelo método de referência.

O estabelecimento dos referidos critérios irá permitir ao laboratório uma mais rápida tomada de decisão e poupança de recursos (tempo de ocupação dos analistas e material de laboratório).

Condições necessárias a aplicar os critérios:

- Fazer sempre os lotes iniciais na mesma altura que as misturas.
- Cada tipo de mistura tem um modelo – parte-se sempre dos valores do C18:1 e C18:2 do produto maioritário, somando ou diminuindo a repetibilidade do FTNIR para o ácido gordo em questão (C18:1 ou C18:2).

O próximo passo será a explicação da aplicação do critério para cada mistura estudada.

Mistura: Soja – Girassol (soja maioritário)

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, superiores aos valores iniciais do produto maioritário mais a repetibilidade.

Conclusão: embora as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 da soja e do girassol sejam baixas, a metodologia é sensível para misturas a partir de 2% de girassol na soja.

Mistura: Girassol – Soja (girassol maioritário)

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, inferiores aos valores iniciais do produto maioritário menos a repetibilidade de cada um dos ácidos gordos selecionados.

Conclusão: dado que as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 do girassol e da soja são baixas, a metodologia não tem a sensibilidade requerida para detetar misturas.

Mistura: Azeite – Soja (azeite maioritário)

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, para C18:1, inferiores ao valor inicial do produto maioritário menos a repetibilidade e, para C18:2, superiores ao valor inicial mais a repetibilidade.

Conclusão: dado que as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 do azeite e da soja são elevadas, a metodologia é sensível para misturas logo a partir de 1% de soja no azeite.

Mistura: Azeite - Girassol (azeite maioritário)

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, para C18:1, inferiores ao valor inicial do produto maioritário menos a repetibilidade e, para C18:2, superiores ao valor inicial mais a repetibilidade.

Conclusão: dado que as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 do azeite e do girassol são elevadas, a metodologia é sensível para misturas logo a partir de 1% de girassol no azeite.

Mistura: Soja – Azeite (soja maioritário)

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, para C18:1, superiores ao valor inicial do produto maioritário mais a repetibilidade e, para C18:2, inferiores ao valor inicial menos a repetibilidade.

Conclusão: dado que as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 da soja e do azeite são elevadas, a metodologia é sensível para misturas logo a partir de 1% de azeite na soja.

Mistura: Girassol – Azeite

Critério: quando os valores obtidos de C18:1 e C18:2 da amostra em teste forem, simultaneamente, para C18:1, superiores ao valor inicial do produto maioritário mais a repetibilidade e, para C18:2, inferiores ao valor inicial menos a repetibilidade.

Conclusão: dado que as diferenças em termos de C18:1 a C18:2 da soja e do azeite são elevadas, a metodologia é sensível para misturas logo a partir de 1% de azeite no girassol.

Tabela 4.30 - Quadro das repetibilidades para os ácidos gordos C18:1 e C18:2.

C18:1	GIRASSOL		SOJA		AZEITE
Valores individuais	0,16	0,23	0,11	0,19	0,30
Média	0,2		0,2		0,3
C18:2	GIRASSOL		SOJA		AZEITE
Valores individuais	0,26	0,26	0,13	0,11	0,08
Média	0,3		0,1		0,1

Todo o conjunto de dados referentes à aplicação dos critérios encontram-se no Anexo D.

5. Conclusão

Tendo em consideração a espectroscopia NIR, associada a técnicas de quimiometria, é possível a construção de modelos de calibração capazes de quantificarem as propriedades físico-químicas dos óleos vegetais e dos azeites.

O contínuo aperfeiçoamento dos modelos é essencial para alcançar a robustez e a precisão necessárias para a deteção de produtos fora das especificações.

Foram testados os modelos referentes aos óleos de soja cru, girassol cru e girassol refinado.

Os testes realizados no software forneceram os principais parâmetros estatísticos que avaliam a robustez de um modelo (RPD, R^2 e RMSEP).

Conforme o resultado, concluiu-se que o modelo do ácido gordo C18:3 do girassol cru apresentava problemas em relação à sua capacidade preditiva.

Constatou-se que por vezes a divisão em grupos de amostras pode levar com que o modelo desenvolvido para determinado parâmetro tenha um número de amostras reduzido e/ou com pouca variabilidade tendo em consideração a baixa variação geográfica da semente.

Um contributo importante na validação de um método interno, consiste na comparação de resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método tomado como referência.

Validou-se o método interno, FT-NIR, isto é, estudou-se a proximidade dos resultados obtidos entre os dois métodos de ensaio avaliando a exatidão da metodologia FT-NIR relativamente ao método de referência (laboratório).

Os resultados obtidos concluíram que o método interno tem uma ótima proximidade de resultados para os parâmetros dos óleos vegetais e do azeite comparativamente ao método de referência. Permitindo assim, o controlo dos óleos de soja, girassol e azeite, em todas as fases do processo de fabrico.

A metodologia FT-NIR pode ser vista como uma mais-valia, alcançando resultados mais rápidos, eficazes e de confiança sem recorrer por vezes a métodos de referência que consomem reagentes e são mais demorosos.

Relativamente ao ensaio das misturas de azeite e dos óleos vegetais, nomeadamente, os óleos de girassol refinado e soja refinado, obtiveram-se resultados novos e importantes para deteção de adulterações através do método FT-NIR. Contornaram-se problemas relativos à sensibilidade do equipamento e definiram-se critérios para as misturas realizadas.

O estabelecimento dos critérios para as misturas irá permitir ao laboratório uma mais rápida tomada de decisão e poupança de recursos (tempo de ocupação dos analistas e material de laboratório).

5.1. Perspetivas Futuras

Contínuo aperfeiçoamento dos modelos existentes no Sistema do FT-NIR, especialmente nos modelos referentes a produtos produzidos em menor quantidade. Permitindo assim a deteção de produtos fora da especificação.

Aumentar o número de amostras dos óleos brutos, nomeadamente do óleo de girassol cru, para que se possa alargar a sua gama operatória. Para o óleo de soja cru, introduzir mais amostras analisadas pelos métodos de referência.

Alargar a gama de calibração dos modelos do óleo de girassol refinado. Se possível introduzir amostras com maior variabilidade nos parâmetros.

Implementação do procedimento criado para a identificação de adulteração nas amostras de controlo de óleos vegetais complementando as análises realizadas pelos métodos de referência. A sua implementação irá permitir economizar no número de técnicas a utilizar e obter resultados mais rápidos e confiáveis.

Criar um critério para a identificação de adulteração para a mistura de óleo de girassol e óleo de soja (óleo de girassol maioritário).

6. Bibliografia

- [1] Silva, S.A (2015). *Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos*. Brasil: Universidade de São Paulo.
- [2] Rizwana, S (2008). *Analytical tool for rapid analysis of edible oil*.
- [3] Freire, D. B. (2002). *Controlo de qualidade de óleos vegetais comercializados na Região do Grande Porto*. Porto: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.
- [4] SOVENA - Grupo Sovena. [Online] Disponível em: <http://www.sovenagroup.com/pt/> [Consultado em Março de 2017]
- [5] Bruker. (s.d). Edible Oils and Fats - FT-NIR Analyzers for QC in the Lab and Production. *Oil NIR BROCHURE*. Bruker.
- [6] Scientific. T. (s.d). Advantages of Fourier-Transform Near- Infrared Spectroscopy. Thermo Scientific.
- [7] SOVENA. (2015). *Sustainability Report*. Sovena.
- [8] Pereira, W. d. (2012). *Calibração multivariada de misturas de óleos vegetais utilizando a espectroscopia de infravermelho médio*. Universidade Estadual da Paraíba.
- [9] SOVENA. (s.d.). *Manual de Boas Práticas de Fabrico*. Barreiro: Sovena.
- [10] Gunstone, F. D. (2002). *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties, and Uses*. Blackwell Publishing, CRC Press.
- [11] O'Brien, R. D. (2009). *Fat and Oils: Formulating and Processing for Applications*. CRC Press.
- [12] Codex Stan 210-1999 (2009) - Codex Standard for named vegetables oils.
- [13] *The Olive Oil Source*. (s.d.). [Online] Disponível em: <https://www.oliveoilsource.com/> [Consultado em: Maio de 2017]
- [14] Casa do Azeite. Azeite - Como escolher. [Online] Disponível em: <http://www.casadoazeite.pt/Azeite/Como-escolher> [Consultado em Maio de 2017]
- [15] Boskou, D. (2006). *Olive Oil and Technology*. Second Edition. Greece: AOCS Press.
- [16] Gestão de Qualidade. (s.d.). *Gestao de Qualidade - Normas ISO*. [Online] Disponível em <http://gestao-de-qualidade.info/normas-iso.html> [Consultado em Junho de 2017]
- [17] Regulamento Comunitário (CEE) nº 2568/91 da Comissão de 11 de julho de 1991 com as respetivas alterações, nomeadamente, a última alteração de acordo com o Regulamento de Execução (UE) 2015/1833 de 2015.
- [18] Codex Stan 033-1981 (2009) - Standard for olive oils and olive pomace oils.
- [19] Ilharco, L. M. (s.d.). Espetroscopia de Infravermelho uma Técnica Antiga, Sempre Atual. *Técnicas Experimentais*, 34-45.
- [20] Burns, D. A., & Ciurczak, E. W. (2008). *Handbook of Near- Infrared. Third Edition*. CRC Press.

- [21] Monteiro, A.d. (2011). *Estudo de Aspetos Estatísticos da Espectroscopia na Região do Infravermelho Próximo*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- [22] Metrohm. (s.d.). *NIR Spectroscopy. A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes*. Herisau, Suíça: Metrohm.
- [23] Almeida, F. M. (2009). *Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril*. Lisboa: IST-UTL.
- [24] Leitão, T. M. (2012). *Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas*. Porto: Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde.
- [25] Embapra. (Outubro 2010). *A Espectroscopia na região do Infravermelho e algumas aplicações*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura.
- [26] Bruker. (s.d). *Application of FT-NIR in the Edible Oil Industry*. Bruker Optic.
- [27] Ferreira, M. C & Antunes , A. M. & Melgo, M.S. & L.O. Volpe, P. (s.d.). *Artigo Quimiometria I: Calibração Multivariada, Um Tutorial*.
- [28] Almeida, F. M. (2008/2009). *Artigo Fourier Transform Near Spectroscopy (FT-NIR) in Characterization of Flour for Children Feed*.
- [29] Otto, M. (2010). *Chemometrics : Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Pearson.
- [30] Miller, J. N. & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Pearson.
- [31] Bruker. (s.d). *OPUS - Spectroscopy Software. User Manual Qant*. Bruker.
- [32] Bruker. (s.d). *MPA - Multi Purpose Analyzer. User Manual*. Bruker Optics.
- [33] Codex Stan 210-1999 (2009) - *Discussion Paper on the Revision of Limits of Oleic and Linoleic Acids in Sunflowerseed Oils in the Standard for Named Vegetable Oils*. (Documento interno)
- [34] Relacre. (s.d). *Relacre - Associação de Laboratórios Acreditados em Portugal*. [Online] Disponível em <http://www.relacre.pt/pt> [Consultado em Julho de 2017]
- [35] Planeamento e Controlo de Qualidade - *Aulas de Apoio*. (2017). Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa.
- [36] Relacre. (s.d). *Guia Relacre 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Associação de Laboratórios Acreditados em Portugal.
- [37] Costa, H. M. (2012). *Azeites Aromatizados: Estudo da Influência do Agente Aromatizante na Composição Química e Resistência à Oxidação*. Instituto Politénico de Bragança - Escola Superior Agrária.
- [38] Cavaco, P. R. (2017). *Validação de métodos laboratoriais aplicados à caraterização de azeites e óleos*. Instituto Politécnico de Santarém.
- [39] Neves, H. J. (1994). *Caraterização de Óleos Alimentares pelo Perfil de Trigliceridos*. *Química Alimentar*, pp.58-61.

7. Anexos

7.1. Anexo A: Diagrama de Extração do Azeite

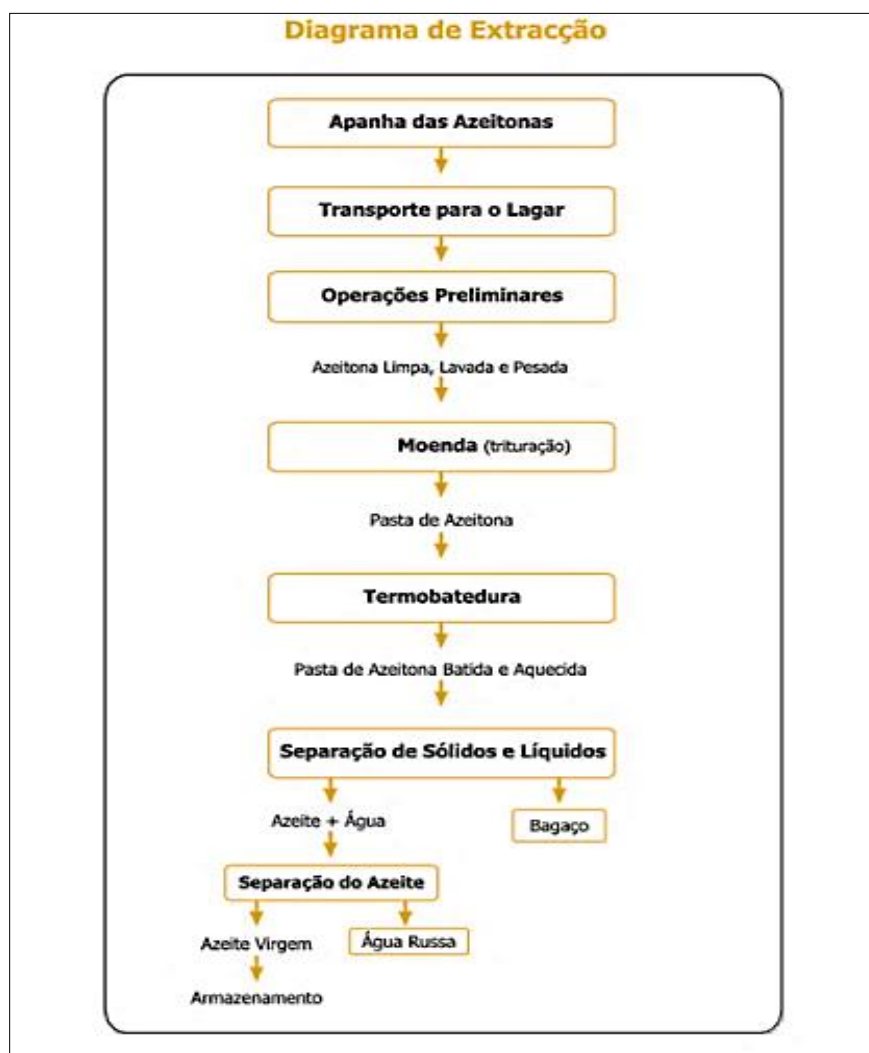


Figura 7.1- Esquema de Extração do Azeite. Adaptado de [14].

7.2. Anexo B: Amostras

7.2.1. Gama de valores das amostras

Amostras analisadas pelos métodos de referência, no Laboratório SOVENA-Consumer Goods, e pelo equipamento FT-NIR.

As Tabelas 7.1 e 7.2 estão divididas de acordo com a ordem de análise dos óleos vegetais estudados no trabalho.

Óleo de soja cru

Tabela 7.1 - Gama de valores das amostras do óleo de soja cru.

Unidades	Gama das Amostras		
	Parâmetros	Min	Max
%	Acidez	0,44	1,06
%	H+MV	0,05	0,17
meqO ₂ /kg	Peróxido	0,0	0,0
mg/kg	Sabão
ppm	Fósforo	117	223
%	Impurezas	0,02	0,21
Horas	Estabilidade
Abs UV	E230
Abs UV	E270
	Anisidina
%	Insaponificável
%	C14:0 (mirístico)	0,07	0,09
%	C16:0 (palmitico)	11,78	10,29
%	C16:1 (Palmitoleico)	0,07	0,12
%	C18:0 (esteárico)	3,09	3,49
%	C18:1 (oleico)	23,00	24,77
%	C18:1 trans	0,0	0,0
%	C18:2 (Linoleico)	52,20	57,79
%	C18:2 trans	0,0	0,0
%	C18:3 (Linolénico)	6,19	7,68
%	C18:3 trans	0,0	0,0
%	C20:0 (araquídico)	0,25	0,38
%	C20:1	0,17	0,24
%	C22:0	0,30	0,42
%	C22:1	0,0	0,0
%	C24:0	0,05	0,16

Óleo de girassol cru

Tabela 7.2 - Gama de valores das amostras do óleo de girassol cru.

Unidades	Gama das Amostras		
	Parâmetros	Min	Max
%	Acidez	1,2	1,5
%	H+MV
meqO ₂ /kg	Peróxido
mg/kg	Sabão	0,0	0,0
ppm	Fósforo
%	Impurezas
Horas	Estabilidade
Abs UV	E230
Abs UV	E270
	Anisidina
%	Insaponificável
%	C14:0 (mirístico)	0,07	0,09
%	C16:0 (palmitico)	6,34	7,03
%	C16:1 (Palmitoleico)	0,12	0,13
%	C18:0 (esteárico)	3,1	3,3
%	C18:1 (oleico)	30,80	32,70
%	C18:1 trans	0,00	0,00
%	C18:2 (Linoleico)	55,52	57,72
%	C18:2 trans	0,00	0,00
%	C18:3 (linolénico)	0,06	0,10
%	C18:3 trans	0,00	0,00
%	C20:0 (araquídico)	0,21	0,25
%	C20:1	0,14	0,16
%	C22:0	0,52	0,73
%	C22:1	0,00	0,00
%	C24:0	0,16	0,27

7.2.2. Espectros das amostras

Nas Figuras 7.2, 7.3 e 7.4, encontram-se os espectros de todas as amostras analisadas no FT-NIR dos óleos vegetais utilizados no desenvolvimento de testes aos modelos. No caso dos óleos de soja cru e de girassol cru estas amostras também foram usadas para comparação e validação dos métodos de análise.

Óleo de soja cru

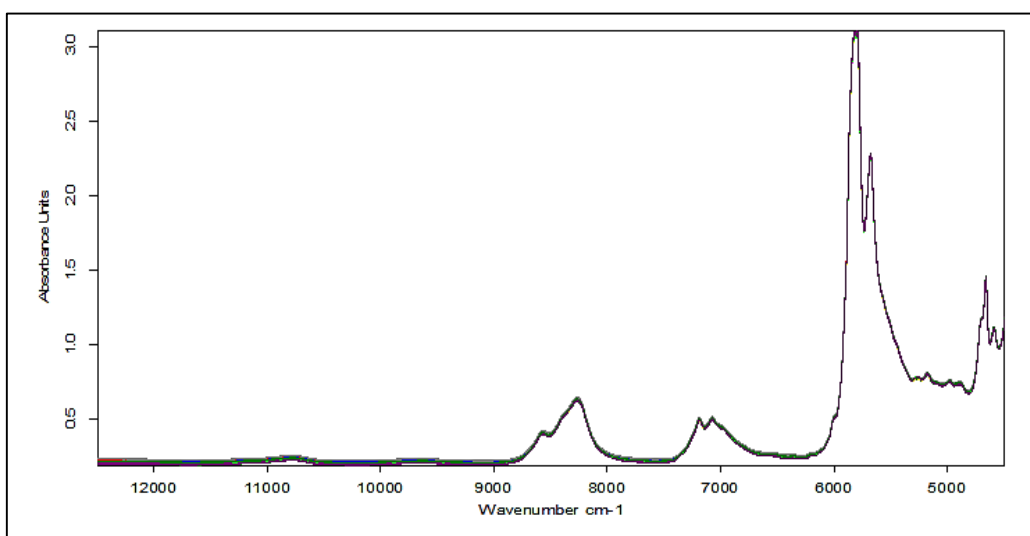


Figura 7.2 - Espectros das amostras do óleo de soja cru.

Óleo de girassol cru

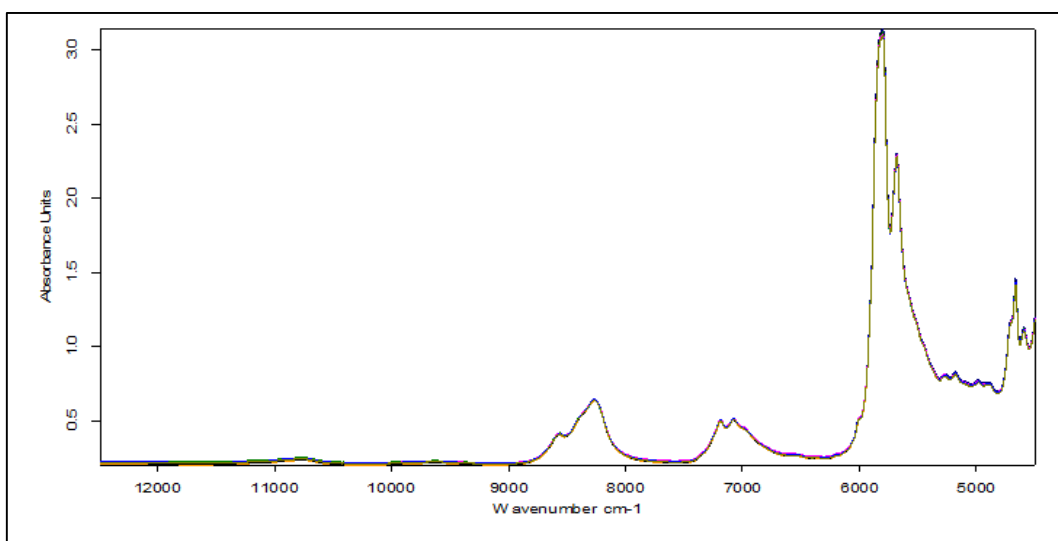


Figura 7.3 - Espectros das amostras de óleo de girassol cru.

Óleo de girassol refinado

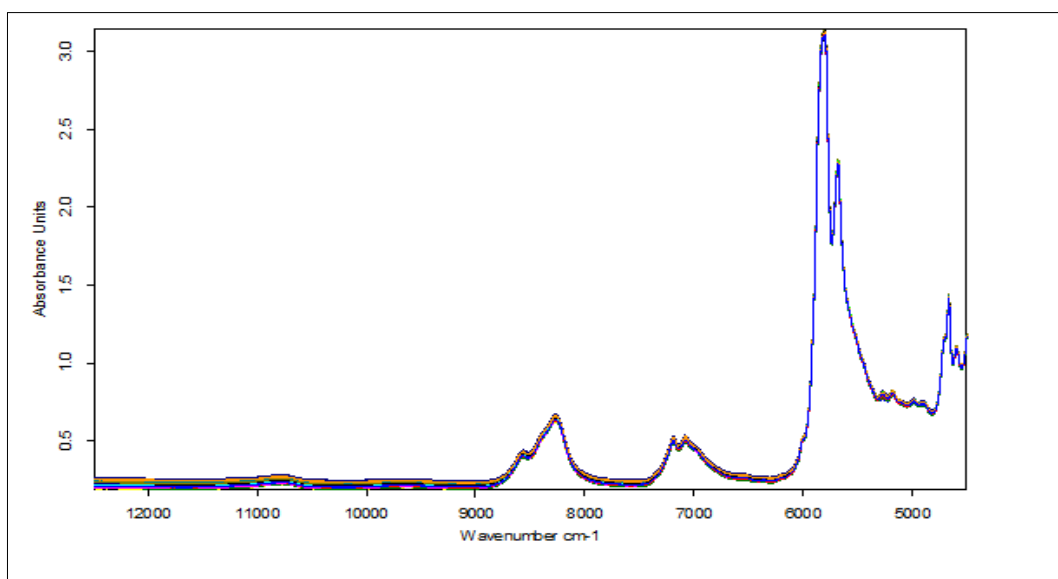


Figura 7.4 - Espectros das amostras de óleo de girassol refinado.

7.3. Anexo C: Tabela FT-NIR

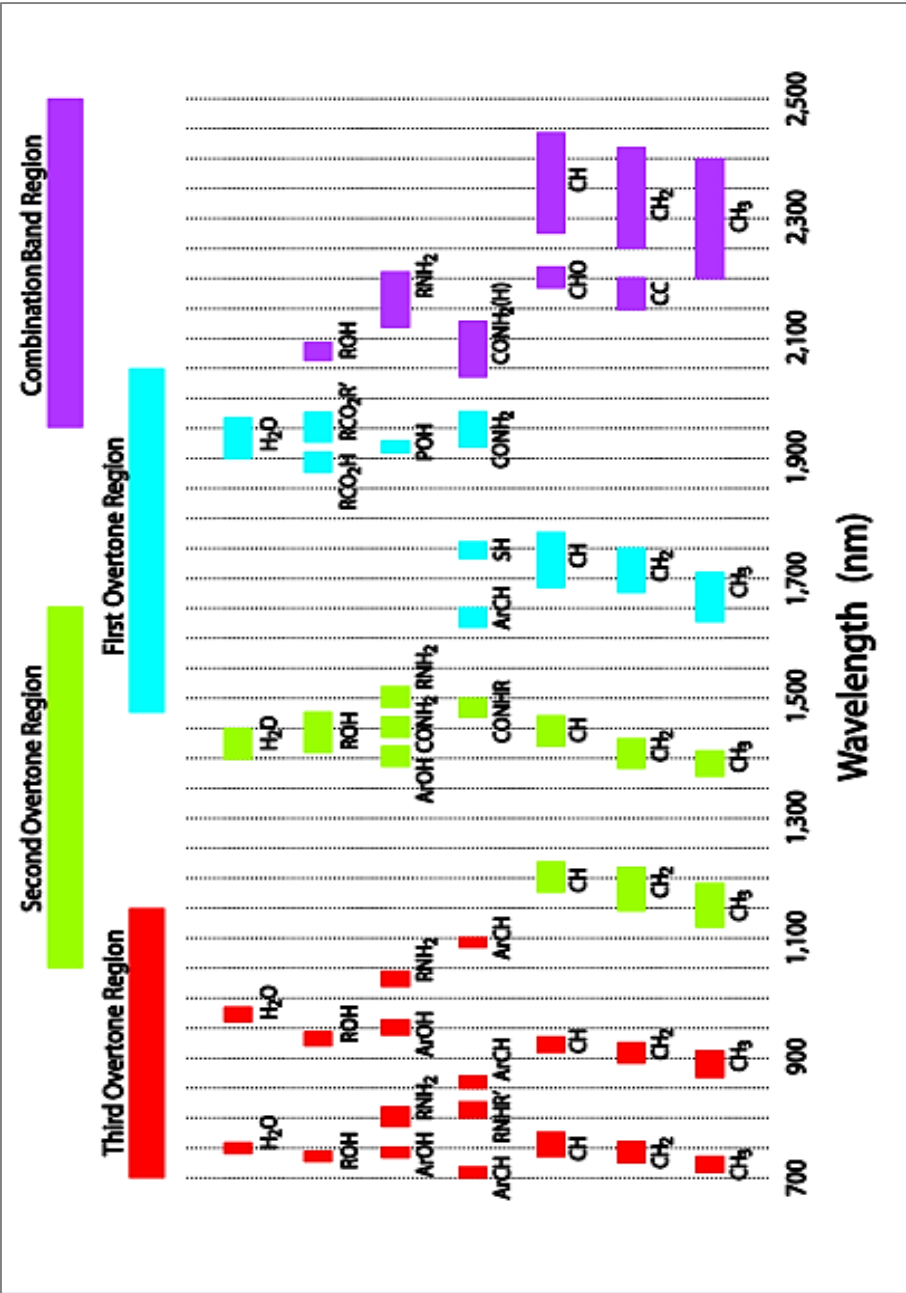


Figura 7.5 - Principais bandas do espectro infravermelho e posições relativas às absorções proeminentes no Infravermelho Próximo.

7.4. Anexo D: Misturas

7.4.1. Espectros das misturas

De seguida, serão apresentados o conjunto de todos os espectros obtidos durante a elaboração das misturas os óleos vegetais soja e girassol e do azeite virgem extra.

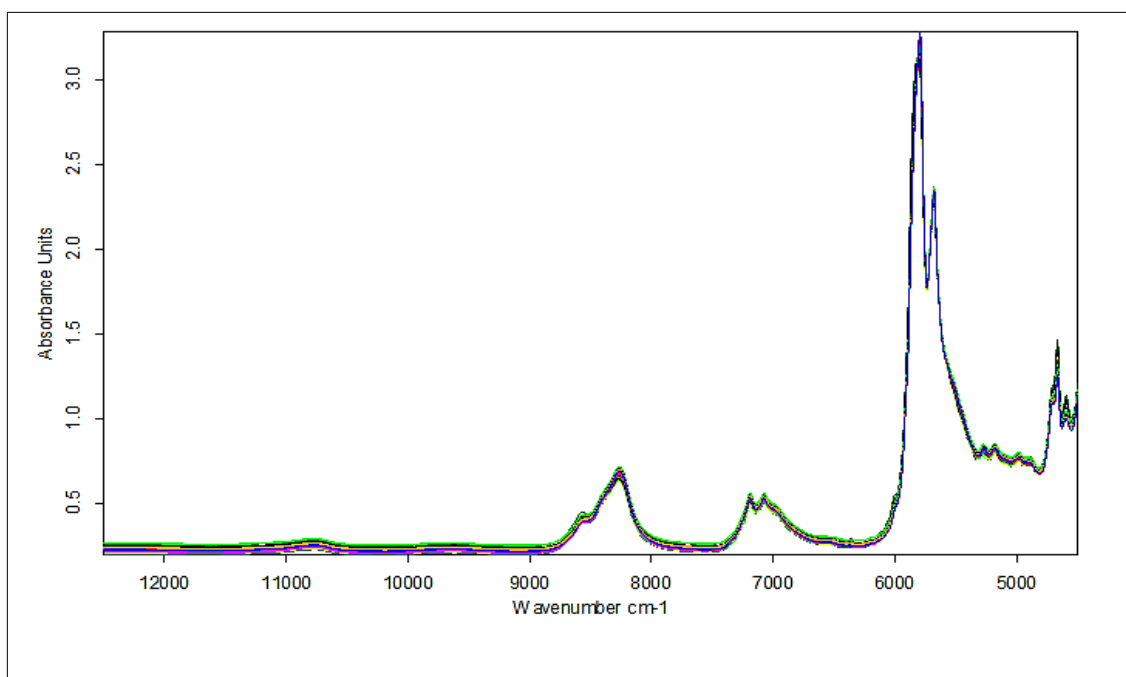


Figura 7.6 - Conjunto de espectros adquiridos da elaboração de misturas.

7.4.2. Resultados das misturas

Os resultados obtidos nos ensaios de misturas encontram-se conforme o que é obtido pelo equipamento FT-NIR.

De seguida apresentam-se todos os resultados adquiridos.

Tabela 7.3 – Resultados dos Ácidos gordos da mistura Girassol- Soja. Parte A.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Soja (100ml)	G (99ml) S (1ml)	G (98 ml) S (2ml)	G (97 ml) S (3 ml)	G (96 ml) S (4ml)	G (95 ml) S (5ml)	G (90 ml) S (10 ml)	G (85 ml) S (15 ml)	G (80 ml) S (20 ml)	G (75 ml) S (25 ml)
C14	0.07805	0.063941	0.077474	0.078048	0.07886	0.080112	0.08199	0.081089	0.07856	0.080809	0.081768
C16:0	7.1586	11.034	7.2024	6.875	7.0549	6.9802	6.9542	6.9869	7.0058	6.9357	6.8837
C16:1	0.13537	0.073094	0.13172	0.13961	0.1348	0.13185	0.13452	0.13416	0.12996	0.12421	0.123
C18:0	3.1136	3.4436	3.1378	3.2291	3.2009	3.2809	3.2493	3.3195	3.3557	3.4023	3.5382
C18:1	30.779	25.464	30.64	30.563	30.367	30.089	30.242	29.957	29.592	29.323	28.813
C18:2	57.297	51.989	57.524	57.558	57.667	57.907	57.713	57.902	58.125	58.396	58.841
C18:3	0.054443	5.6725	0.054779	0.051661	0.059789	0.054283	0.055807	0.058925	0.051456	0.059673	0.057427
Trans L + Ln	0.30862	0.74289	0.31141	0.30151	0.30155	0.29628	0.30018	0.30267	0.32096	0.30039	0.30345
C20:0	0.24032	0.38605	0.24537	0.24078	0.24204	0.24659	0.24662	0.24478	0.24502	0.24514	0.24654
C20:1	0.13914	0.22519	0.14206	0.13804	0.14068	0.14335	0.14206	0.14508	0.15024	0.15085	0.15312
C22:0	0.66821	0.39386	0.66769	0.63624	0.65528	0.63576	0.6428	0.64546	0.64232	0.62643	0.60923
C24:0	0.23035	0.13644	0.22291	0.22095	0.22232	0.21374	0.21295	0.22008	0.21211	0.21702	0.20473

Tabela 7.4 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Soja-Girassol. Parte A.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Soja (100ml)	S (99ml) G (1ml)	S (98 ml) G (2ml)	S (97 ml) G (3 ml)	S (96 ml) G (4ml)	S (95 ml) G (5ml)	S (90 ml) G (10 ml)	S (85 ml) G (15 ml)	S (80 ml) G (20 ml)	S (75 ml) S (25 ml)
C14	0.07805	0.063941	0.066768	0.066725	0.069781	0.071453	0.069279	0.07491	0.068564	0.072899	0.075698
C16:0	7.1586	11.034	10.964	10.688	10.759	10.729	10.265	10.084	10.265	9.8783	9.5244
C16:1	0.13537	0.073094	0.074631	0.076645	0.076738	0.073597	0.078235	0.079968	0.77197	0.083881	0.084835
C18:0	3.1136	3.4436	3.3812	3.3395	3.3379	3.3956	3.292	3.2698	3.2445	3.1831	3.1203
C18:1	30.779	25.464	25.675	25.826	25.583	25.795	25.828	26.225	26.527	26.762	27.075
C18:2	57.297	51.989	52.14	52.203	52.178	52.234	52.327	52.605	52.856	53.151	53.394
C18:3	0.054443	5.6725	5.5846	5.5679	5.5593	5.4313	5.3642	5.1513	4.7361	4.5248	4.3086
TransL + Ln	0.30862	0.74289	0.70295	0.68849	0.67554	0.68312	0.7611	0.6706	0.57009	0.48813	0.47694
C20:0	0.24032	0.38605	0.39585	0.40328	0.39641	0.39979	0.4022	0.41466	0.37498	0.38514	0.38931
C20:1	0.13914	0.22519	0.22884	0.23185	0.23368	0.24312	0.23718	0.25026	0.24416	0.25731	0.26741
C22:0	0.66821	0.39386	0.38985	0.40239	0.40421	0.40254	0.39559	0.3896	0.38664	0.38708	0.40187
C24:0	0.23035	0.13644	0.13149	0.13549	0.13795	0.1497	0.13655	0.14406	0.15382	0.15576	0.15979

Tabela 7.5 - Resultados do Ácidos Gordos da mistura Girassol-Soja. Parte B.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Soja (100ml)	G (99ml) S (1ml)	G (98 ml) S (2ml)	G (97 ml) S (3 ml)	G (96 ml) S (4ml)	G (95 ml) S (5ml)	G (90 ml) S (10 ml)	G (85 ml) S (15 ml)	G (80 ml) S (20 ml)	G (75 ml) S (25 ml)
C14	0,074873	0,062515	0,074531	0,07669	0,076402	0,076187	0,076055	0,076835	0,077713	0,078685	0,080756
C16:0	6,8535	11,123	6,9274	6,9635	6,9552	6,9609	7,0132	7,0146	7,0613	7,1955	7,271
C16:1	0,11430	0,0738	0,11594	0,11401	0,11441	0,1142	0,11282	0,1083	0,10257	0,10347	0,10098
C18:0	3,086	3,4871	3,1696	3,1276	3,1484	3,2478	3,1613	3,235	3,2925	3,3871	3,4741
C18:1	32,194	26,145	32,017	31,94	31,841	31,681	31,621	31,197	30,78	30,308	29,851
C18:2	56,125	51,226	56,298	56,245	56,295	56,405	56,492	56,757	57,118	57,507	57,748
C18:3	0,059039	5,5725	0,061486	0,056668	0,055132	0,058494	0,060154	0,060578	0,062523	0,056811	0,063761
Trans L + Ln	0,094201	0,67382	0,13139	0,15794	0,1539	0,16561	0,16984	0,1796	0,17797	0,20023	0,2197
C20:0	0,24009	0,37149	0,23706	0,24268	0,24072	0,24115	0,24316	0,24362	0,24671	0,24423	0,24817
C20:1	0,13469	0,22966	0,13766	0,14362	0,14879	0,14787	0,15348	0,1529	0,15876	0,16152	0,16722
C22:0	0,68592	0,42655	0,6877	0,70631	0,69918	0,69938	0,70008	0,69503	0,68829	0,68224	0,69385
C24:0	0,23089	0,12011	0,23004	0,21961	0,22841	0,226	0,2206	0,22016	0,21639	0,21269	0,20278

Tabela 7.6 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Soja-Girassol- Parte B.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Soja (100ml)	S (99ml) G (1ml)	S (98 ml) G (2ml)	S (97 ml) G (3 ml)	S (96 ml) G (4ml)	S (95 ml) G (5ml)	S (90 ml) G (10 ml)	S (85 ml) G (15 ml)	S (80 ml) G (20 ml)	S (75 ml) S (25 ml)
C14	0,074873	0,062515	0,059323	0,060435	0,060138	0,063391	0,061582	0,061547	0,063088	0,063139	0,063083
C16:0	6,8535	11,123	10,978	10,994	10,948	10,918	10,786	10,546	10,388	9,898	9,765
C16:1	0,11430	0,0738	0,073073	0,072381	0,072745	0,070586	0,074438	0,076248	0,076123	0,077764	0,08081
C18:0	3,086	3,4871	3,4993	3,4825	3,4849	3,5668	3,4447	3,4874	3,424	3,3968	3,3691
C18:1	32,194	26,145	26,20	26,312	26,401	26,199	26,436	26,936	27,167	27,395	27,899
C18:2	56,125	51,226	51,334	51,456	51,416	51,504	51,388	51,937	51,945	52,145	52,329
C18:3	0,059039	5,5725	5,5792	5,4806	5,4006	5,2962	5,3164	4,9783	4,7183	4,3821	4,159
TransL + Ln	0,094201	0,67382	0,63597	0,71412	0,63764	0,55429	0,60832	0,61556	0,44449	0,42492	0,40814
C20:0	0,24009	0,37149	0,36177	0,36348	0,35769	0,352	0,35262	0,40285	0,32252	0,32755	0,31934
C20:1	0,13469	0,22966	0,23113	0,23163	0,23323	0,24639	0,23937	0,23817	0,25321	0,26138	0,26579
C22:0	0,68592	0,42655	0,43986	0,43475	0,42477	0,43449	0,42956	0,43269	0,43695	0,43128	0,42657
C24:0	0,23089	0,12011	0,12051	0,13021	0,11094	0,12902	0,13121	0,12854	0,1384	0,14344	0,14369

Tabela 7.7 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Soja-Azeite. Parte C.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Azeite (100ml)	S (99ml) A (1ml)	S (98 ml) A (2ml)	S (97 ml) A (3 ml)	S (96 ml) A (4ml)	S (95 ml) A (5ml)	S (90 ml) A (10 ml)	S (85 ml) A (15 ml)	S (80 ml) A (20 ml)	S (75 ml) A (25 ml)
C14	0,062515	0,0071314	0,061628	0,064427	0,062577	0,06302	0,064547	0,07007	0,074409	0,078167	0,083478
C16:0	11,123	12,3	10,896	11,093	10,957	10,728	10,989	10,883	10,736	10,665	10,383
C16:1	0,0738	0,83039	0,077152	0,070483	0,075545	0,082654	0,083336	0,094184	0,10387	0,11745	0,13226
C18:0	3,4871	3,0561	3,4933	3,5901	3,5479	3,4599	3,4846	3,5166	3,4716	3,4452	3,3788
C18:1	26,145	78,693	27,019	27,002	27,517	28,438	29,503	31,341	34,261	37,132	40,063
C18:2	51,226	4,2547	50,655	50,52	50,031	49,328	48,451	46,819	44,069	41,615	38,924
C18:3	5,5725	0,65492	5,4951	5,368	5,3767	5,2774	5,0751	4,7333	4,2868	3,9075	3,4094
C20:0	0,37149	0,39172	0,38538	0,3628	0,35614	0,37246	0,36081	0,38097	0,37977	0,38419	0,40972
C20:1	0,22966	0,21016	0,23499	0,2527	0,24231	0,24588	0,25715	0,27593	0,30171	0,32535	0,35408
C22:0	0,42655	0,10864	0,45581	0,45151	0,46777	0,48588	0,51096	0,55722	0,61776	0,67727	0,75238
C24:0	0,12011	0,041829	0,11392	0,1281	0,12289	0,12387	0,1299	0,13439	0,14979	0,15997	0,16382

Tabela 7.8 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Girassol-Azeite. Parte C.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Azeite (100ml)	G (99ml) A (1ml)	G (98 ml) A (2ml)	G (97 ml) A (3 ml)	G (96 ml) A (4ml)	G (95 ml) A (5ml)	G (90 ml) A (10 ml)	G (85 ml) A (15 ml)	G (80 ml) A (20 ml)	G (75 ml) A (25 ml)
C14	0,074873	0,0071314	0,076203	0,072095	0,070677	0,069368	0,069343	0,066158	0,067709	0,065298	0,061521
C16:0	6,8535	12,3	6,9011	6,8946	6,8856	6,8852	6,8779	6,9457	6,9358	6,956	6,9203
C16:1	0,1143	0,83039	0,11688	0,11474	0,11774	0,11822	0,11822	0,11878	0,12334	0,12444	0,12456
C18:0	3,086	3,0561	3,1248	3,0642	3,0635	3,0053	3,029	2,9543	2,8811	2,9212	2,9244
C18:1	32,194	78,693	33,111	33,464	34,161	35,146	35,547	38,295	40,86	43,01	45,502
C18:2	56,125	4,2547	55,223	54,696	53,977	52,928	52,673	49,631	46,876	44,746	42,198
C18:3	0,059039	0,65492	0,063744	0,060423	0,056164	0,055079	0,061147	0,056627	0,057983	0,056611	0,06117
C20:0	0,24009	0,39172	0,23512	0,23908	0,2374	0,240	0,23632	0,24802	0,25122	0,25606	0,25273
C20:1	0,13469	0,21016	0,11913	0,12278	0,1248	0,1267	0,12091	0,14093	0,15646	0,15946	0,16686
C22:0	0,68592	0,10864	0,69261	0,71466	0,7097	0,7323	0,72677	0,79202	0,82576	0,85931	0,88328
C24:0	0,23089	0,041829	0,23395	0,24636	0,23323	0,24227	0,2452	0,24992	0,23922	0,25421	0,24207

Tabela 7.9 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Azeite-Soja. Parte C.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Azeite (100ml)	A (99ml) S (1ml)	A (98 ml) S (2ml)	A (97 ml) S (3 ml)	A (96 ml) S (4ml)	A (95 ml) S (5ml)	A (90 ml) S (10 ml)	A (85 ml) S (15 ml)	A (80 ml) S (20 ml)	A (75 ml) S (25 ml)
C14	0,062515	0,0071314	0,0084176	0,008566	0,0091259	0,010272	0,0099529	0,013825	0,015276	0,018913	0,021944
C16:0	11,123	12,30	12,303	12,129	12,466	12,614	12,469	13,015	13,778	14,429	15,09
C16:1	0,0738	0,83039	0,86104	0,87328	0,91651	0,96659	0,91268	0,94267	1,0977	1,1617	1,2768
C18:0	3,4871	3,0561	2,9121	3,0511	2,9422	2,9277	2,9063	2,6155	2,5351	2,2387	2,0949
C18:1	26,145	78,693	77,375	76,798	76,561	75,658	75,171	72,566	67,855	64,601	61,65
C18:2	51,226	4,2547	5,4454	5,7578	6,0371	6,7833	7,1484	9,6919	13,141	15,778	18,402
C18:3	5,5725	0,65492	0,67489	0,6486	0,65135	0,66914	0,66564	0,73559	0,7238	0,77666	0,79084
C20:0	0,37149	0,39172	0,41326	0,38578	0,39717	0,39795	0,39953	0,43891	0,45278	0,48595	0,47807
C20:1	0,22966	0,21016	0,22587	0,22383	0,23935	0,25653	0,24502	0,29064	0,32582	0,36893	0,40958
C22:0	0,42655	0,10864	0,10983	0,10979	0,11224	0,11344	0,11388	0,11882	0,12643	0,13104	0,13654
C24:0	0,12011	0,041829	0,044674	0,04575	0,04403	0,046517	0,046319	0,04853	0,050743	0,052533	0,056278

Tabela 7.10 - Resultados dos Ácidos Gordos da mistura Azeite-Girassol. Parte C.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Azeite (100ml)	A (99ml) G (1ml)	A (98 ml) G (2ml)	A (97 ml) G (3 ml)	A (96 ml) G (4ml)	A (95 ml) G (5ml)	A (90 ml) G (10 ml)	A (85 ml) G (15 ml)	A (80 ml) G (20 ml)	A (75 ml) G (25 ml)
C14	0,074873	0,0071314	0,0084672	0,0087142	0,0090894	0,0085222	0,0095416	0,01234	0,013676	0,016347	0,020978
C16:0	6,8535	12,3	12,177	12,143	12,174	12,074	12,457	12,713	12,849	13,088	13,155
C16:1	0,1143	0,83039	0,80443	0,81986	0,82108	0,84823	0,93366	0,95718	1,0022	0,9929	0,96822
C18:0	3,086	3,0561	2,9783	2,925	2,9727	2,9624	2,9448	2,7904	2,6588	2,535	2,4335
C18:1	32,194	78,693	77,349	76,905	76,445	76,144	75,47	72,716	69,424	67,336	64,537
C18:2	56,125	4,2547	5,5377	5,9379	6,2382	6,4062	6,9189	9,6155	12,322	14,502	17,38
C18:3	0,059039	0,65492	0,65795	0,66982	0,66996	0,65578	0,65846	0,69591	0,70268	0,73394	0,76393
C20:0	0,24009	0,39172	0,40494	0,41361	0,40609	0,39012	0,40896	0,42809	0,4616	0,46059	0,48175
C20:1	0,13469	0,21016	0,23446	0,22902	0,23402	0,23645	0,25423	0,29459	0,31285	0,35105	0,4049
C22:0	0,68592	0,10864	0,1104	0,10982	0,11163	0,11103	0,11364	0,11867	0,12376	0,12906	0,13302
C24:0	0,23089	0,041829	0,045922	0,04442	0,043414	0,044482	0,045905	0,047442	0,049099	0,049913	0,052488

7.4.3. Resultados dos Critérios

Tabela 7.11 – Resultados dos ácidos gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Soja-Girassol.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Girassol (100ml)						
C18:1	25,464	30,779						
C18:2	51,989	57,297						
S (99ml) G (1ml)	S (98 ml) G (2ml)	S (97 ml) G (3 ml)	S (96 ml) G (4ml)	S (95 ml) G (5ml)	S (90 ml) G (10 ml)	S (85 ml) G (15 ml)	S (80 ml) G (20 ml)	S (75 ml) G (25 ml)
25.675	25.826	25.583	25.795	25.828	26.225	26.527	26.762	27.075
52.14	52.203	52.178	52.234	52.327	52.605	52.856	53.151	53.394

Tabela 7.12- Resultados dos ácidos gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Girassol-Soja.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Soja (100ml)						
C18:1	30,779	25,464						
C18:2	57,297	51,989						
G (99ml) S (1ml)	G (98 ml) S (2ml)	G (97 ml) S (3 ml)	G (96 ml) S (4ml)	G (95 ml) S (5ml)	G (90 ml) S (10 ml)	G (85 ml) S (15 ml)	G (80 ml) S (20 ml)	G (75 ml) S (25 ml)
30.64	30.563	30.367	30.089	30.242	29.957	29.592	29.323	28.813
57.524	57.558	57.667	57.907	57.713	57.902	58.125	58.396	58.841

Tabela 7.13 - Resultados dos ácidos gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Azeite-Soja.

Ácidos Gordos (%)	Azeite (100ml)	Soja (100ml)						
C18:1	78,693	26,145						
C18:2	4,2547	51,226						
A (99ml) S (1ml)	A (98 ml) S (2ml)	A (97 ml) S (3 ml)	A (96 ml) S (4ml)	A (95 ml) S (5ml)	A (90 ml) S (10 ml)	A (85 ml) S (15 ml)	A (80 ml) S (20 ml)	A (75 ml) S (25 ml)
77,375	76,798	76,561	75,658	75,171	72,566	67,855	64,601	61,65
5,4454	5,7578	6,0371	6,7833	7,1484	9,6919	13,141	15,778	18,402

Tabela 7.14- Resultados dos ácidos gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Azeite-Girassol.

Ácidos Gordos (%)	Azeite (100ml)	Girassol (100ml)						
C18:1	78,693	32,194						
C18:2	4,2547	56,125						
A (99ml) G (1ml)	A (98 ml) G (2ml)	A (97 ml) G (3 ml)	A (96 ml) G (4ml)	A (95 ml) G (5ml)	A (90 ml) G (10 ml)	A (85 ml) G (15 ml)	A (80 ml) G (20 ml)	A (75 ml) G (25 ml)
77,349	76,905	76,445	76,144	75,47	72,716	69,424	67,336	64,537
5,5377	5,9379	6,2382	6,4062	6,9189	9,6155	12,322	14,502	17,38

Tabela 7.15- Resultados dos Ácidos Gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Soja-Azeite.

Ácidos Gordos (%)	Soja (100ml)	Azeite (100ml)						
C18:1	26,145	78,693						
C18:2	51,226	4,2547						
S (99ml) A (1ml)	S (98 ml) A (2ml)	S (97 ml) A (3 ml)	S (96 ml) A (4ml)	S (95 ml) A (5ml)	S (90 ml) A (10 ml)	S (85 ml) A (15 ml)	S (80 ml) A (20 ml)	S (75 ml) A (25 ml)
27,019	27,002	27,517	28,438	29,503	31,341	34,261	37,132	40,063
50,655	50,52	50,031	49,328	48,451	46,819	44,069	41,615	38,924

7.16 - Resultados dos ácidos gordos C18:1 e C18:2 para a mistura Girassol-Azeite.

Ácidos Gordos (%)	Girassol (100ml)	Azeite (100ml)						
C18:1	32,194	78,693						
C18:2	56,125	4,2547						
G (99ml) A (1ml)	G (98 ml) A (2ml)	G (97 ml) A (3 ml)	G (96 ml) A (4ml)	G (95 ml) A (5ml)	G (90 ml) A (10 ml)	G (85 ml) A (15 ml)	G (80 ml) A (20 ml)	G (75 ml) A (25 ml)
33,111	33,464	34,161	35,146	35,547	38,295	40,86	43,01	45,502
55,223	54,696	53,977	52,928	52,673	49,631	46,876	44,746	42,198

